

**A foszfatidil-glicerin fiziológiai szerepe egy obligát fotoautotróf,
a *Synechococcus* sp. PCC7942 cianobaktériumban**

Ph.D. értekezés

Bogos Balázs

Témavezető: Dr. Gombos Zoltán

Biológia Doktori Iskola

MTA Szegedi Biológiai Központ Növénybiológia Intézet

SZTE TTIK

2010

Szeged

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés	7
1. 1. Cianobaktériumok.....	7
1. 1. 1. A cianobaktériumok hagyományos rendszertana	8
1. 1. 2. A cianobaktériumok molekuláris rendszertana.....	8
1. 1. 3. Cianobakteriális kulcsgének és jelentőségük.....	11
1. 2. <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942	13
1. 2. 1. A <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 membránszerveződése	14
1. 2. 2. A <i>Synechococcus</i> sp. PC7942 membránfehérjei.....	17
1. 2. 2. 1. A sejtfal és a külső membrán fehérjei.....	18
1. 2. 2. 2. A citoplazmás membrán fehérjei	19
1. 2. 2. 3. A tilakoid membránok fehérjei	19
1. 2. 2. 3. 1. A fotoszintetikus elektrontranszport lánc	21
1. 3. A <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 membránok lipidösszetétele.....	23
1. 3. 1. Neutrális glikoglicerolipidek a fotoszintetikus membránokban	25
1. 3. 1. 1. A galaktolipidek bioszintézise	26
1. 3. 1. 2. A galaktolipidek szerepe fotoszintetikus membránokban	28
1. 3. 2. Anionos glicerolipidek fotoszintetikus membránokban.	29
1. 3. 2. 1. A PG és az SQDG bioszintézise	29
1. 3. 2. 2. Az SQDG és PG szerepe fotoszintetikus membránokban	31
1. 4. A lipidek szerepe a PSII szerkezeti integritásában és funkcionális működésében	34
2. Célkitűzések.....	40
3. Kísérleti anyagok és módszerek.....	42
3.1. Növekedési feltételek.....	42
3. 2. A mutánsok létrehozása, transzformáció.	42
3. 3. Lipid analízis.....	43
3. 4. A sejtsűrűség, fehérjekoncentráció és pigment tartalom vizsgálata spektroszkópiai módszerekkel	44
3. 5. A fotoszintetikus oxigénfejlesztő aktivitás mérése.....	45
3. 6. Flash-indukált fluoreszcencia lecsengés mérése.....	45
3. 7. Fehérje analízis	46

4. Eredmények	47
4. 1. A <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 <i>cdsA</i> génjének inaktiválása	47
4. 2. A PG kiürülés hatása a <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942/ Δ <i>cdsA</i> mutáns sejtek növekedésére és pigmentösszetételére.	49
4. 3. A PG kiürülés hatása a <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942/ Δ <i>cdsA</i> mutáns sejtek klorofill és fehérjetartalmára.	53
4. 4. A PG megvonás hatása a <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942/ Δ <i>cdsA</i> lipid és zsírsavösszetételére	56
4. 5. A PG szerepe a PSII fehérje alegységek szintézisében, és összeszerelődésében .	58
4. 6. A PG szerepe a <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942/ Δ <i>cdsA</i> mutáns oxigén fejlesztő aktivitásában	60
4. 7. A PG megvonás hatása a flash-indukált fluoreszcencia lecsengés kinetikájára ...	61
5. Az eredmények megvitatása	64
5. 1. A PG kiürülés hatásai a <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942/ Δ <i>cdsA</i> mutáns növekedési tulajdonságaira és pigment összetételére	65
5. 2. A PG éhezés hatása a <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942/ Δ <i>cdsA</i> mutáns lipidösszetételére és a lipidek zsírsavtartalmára	66
5. 3. A PG hatása a PSII alegységeinek szintézisére és összeszerelődésére <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942/ Δ <i>cdsA</i> cianobaktériumban	67
5. 4. A PG kiürülés hatása a <i>Synechococcus</i> sp. PCC7942/ Δ <i>cdsA</i> mutáns fotoszintetikus aktivitására.....	68
6. Összefoglalás	71
7. Idézett közlemények	73
Magyar nyelvű összefoglalás	83
English summary	89
Publikációs lista:	94
Köszönetnyilvánítás:.....	95

Rövidítések jegyzéke

15:0	pentadekánsav
16:0	palmitinsav
18:0	sztearinsav
18:1	olajsav
18:1/18:1 PG	1,2-di-(9E-oktadekanoil)-sn-glicero-3-foszfo-(1'-rac-glicerín)
[³⁵ S]Met	35-ös kénizotópot tartalmazó metionin aminosav
2D	két dimenziós
ABC-transzporter	ATP-kötő kazetta transzporter
ANSA	8-anilino-1-naftalén-szulfonsav
ATP	adenozin-trifoszfát
β-DM	béta-dodecilmaltozid
BSA	borjú szérum albumin
<i>cdsA</i>	CDP-diglicerín-szintáz gén
CL	kardiolipin
Cm	kloramfenikol
CP43	43 kDa fehérje-klorofil komplex, a PSII reakciócentrum belső antenna alegysége
CP47	47 kDa fehérje-klorofil komplex, a PSII reakciócentrum belső antenna alegysége
CTP	citidin-trifoszfát
CYT b ₆ /f	citokróm b ₆ /f
D1	PsbA fehérje, PSII reakciócentrum fehérjealegysége
D2	PsbD fehérje, PSII reakciócentrum fehérjealegysége
D1-Asn266	A D1 fehérje konzervált aminosava
DCMU	3-(3, 4-diklórfenil)-1, 1'-dimetilurea
DG	diacil-glicerín
<i>dgdA</i>	DGDG-szintáz génje
DGDG	digalaktozil-diacilglicerín

ER	endoplazmatikus retikulum
FNR	ferredoxin-NADP ⁺ -oxidoreduktáz
Glc-DG	monoglükózil-diacilglicerin
HEPES	hidroxietil-piperazinil-etánszulfonsav
K _m	kanamycin
LB	Luria-Bertani gazdag tápfolyadék
LHCI/LHCII	PSI, ill. a PSII külső fénybegyűjtő komplexe növényekben
MGDG	monogalaktozil-diacilglicerin
NADP ⁺ /NADH	oxidált, ill. redukált nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát
OD750	750nm-en mért optikai denzitás
ORF	„nyitott leolvasási keret”
P35	karotinoidkötő fehérje
P680	kettes fotokémiai rendszer elsődleges elektrondonorja
P700	egyes fotokémiai rendszer elsődleges elektrondonorja
PAM	pulzus amplitúdó modulációs
pBQ	p-benzokinon
PCR	polimeráz láncreakció
PE	foszfatidil-etanolamin
PG	foszfatidil-glicerin
PGP1/PGP2	foszfatidil-glicerin-foszfát szintáz izoformák
<i>pgsA</i>	foszfatidil-glicerin-foszfát szintáz gén
PQ/PQH ₂	oxidált/redukált plasztokinon
PSI	1. fotokémiai rendszer
PSI(3)	1. fotokémiai rendszer trimerizált formája
PSII	2. fotokémiai rendszer
PSII(1)/PSII(2)	2. fotokémiai rendszer monomer/dimer formája
Q _A /Q _B /Q _C	PSII elektronakceptor
rRNS	riboszómális RNS
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SQD1/SQD2	SQDG-szintáz izoenzimek
SQDG	szulfokinovozil-diacilglicerin

Tris-HCl	2-amino-2-hidroxi-metil-propán-1,3-diol
UDP	uridin-difoszfát
Urea	diamino-metanal

1. Bevezetés

1. 1. Cianobaktériumok

A cianobaktériumok népes csoportját alkotják olyan prokarióta szervezeteknek, melyek képesek az oxigéntermelő fotoszintézisre, valamint egyedüli szénforrásként széndioxid felhasználására. Fotoautotróf anyagcseréjük révén széles körben megtalálhatóak a Földön legkülönbézetesebb, akár extrém környezeti feltételek mellett is (gejzírek, sivatagok, sarki régiók), ahol elegendő fényhez jutnak.¹ Ezeket az élőhelyeket jelenleg benépesítő cianobaktériumok ősei igen fontos szerepet játszottak a bolygó oxigén, szén, és nitrogén körforgása mai arculatának kialakításában tekintve, hogy képviselőik között jelent meg először - az oxigéntermelő fotoszintézis mellett - a légköri nitrogén megkötésének képessége.² Napjainkban megtalálható, tengeri képviselőik jelentős szerepet játszanak az óceánok tápanyagkörforgásában, annak ellenére, hogy az óceáni fitoplankton fajösszetétele igen népes az eukarióta zöldalgáktól kezdve a kovamoszatokon át egészen a pikoplanktonikus méretű cianobaktériumokkal bezárólag valószínűleg teljesen különböző az ősi tengerekétől.³

A Földön található fotoszintetizáló biomaszra mindössze 1%-át képezi az óceáni fitoplankton, mégis a Föld teljes elsődleges termelői kapacitásának közel feléért felelős, ami a megtermelt szerves anyagok 2-3 nagyságrenddel gyorsabb óceáni körforgásának köszönhető, összehasonlítva a szárazföldi viszonyokkal.⁴ Az óceáni fotoszintetikus biomasz domináns képviselői a cianobaktériumok, a *Synechococcus*, és *Prochlorococcus* génuszok (különösen a tápanyagszegény vizekben), tehát jelentőségük a bolygó bioszférájának alakításában egyértelmű. Biológiai folyamataik minél részletesebb megismerése kulcsfontosságú lehet a Föld korai biológiai és környezeti történetének megismerésében.

Széles körben elfogadott továbbá, hogy a ma élő növények és fotoszintetikus algák kloroplasztisza egy, vagy több endoszimbiotikus esemény nyomán fejlődhetett ki az ősi cianobaktériumok képviselőiből.⁵ Kézenfekvő tehát, hogy a növények és eukarióta algák

fotoszintetikus folyamatainak tanulmányozása szempontjából ezek a prokarióták modellszervezetként alkalmazhatóak. Gyorsan növekedő, egysejtű törzseik jelentős kutatások alanyai évtizedek óta, genetikai szempontból sokkal könnyebben módosíthatóak, mint a növények kloroplasztiszai, ezáltal könnyebben vizsgálhatóak a fotoszintézis *in vivo* aspektusai. A legutóbbi évtizedek során 19 törzs teljes genomszekvenciáját határozták meg megnyitva az utat a cianobaktériumok evolúciós, ezen belül pedig a fotoszintézis funkcionális genomikai kutatása előtt is.⁶

1. 1. 1. A cianobaktériumok hagyományos rendszertana

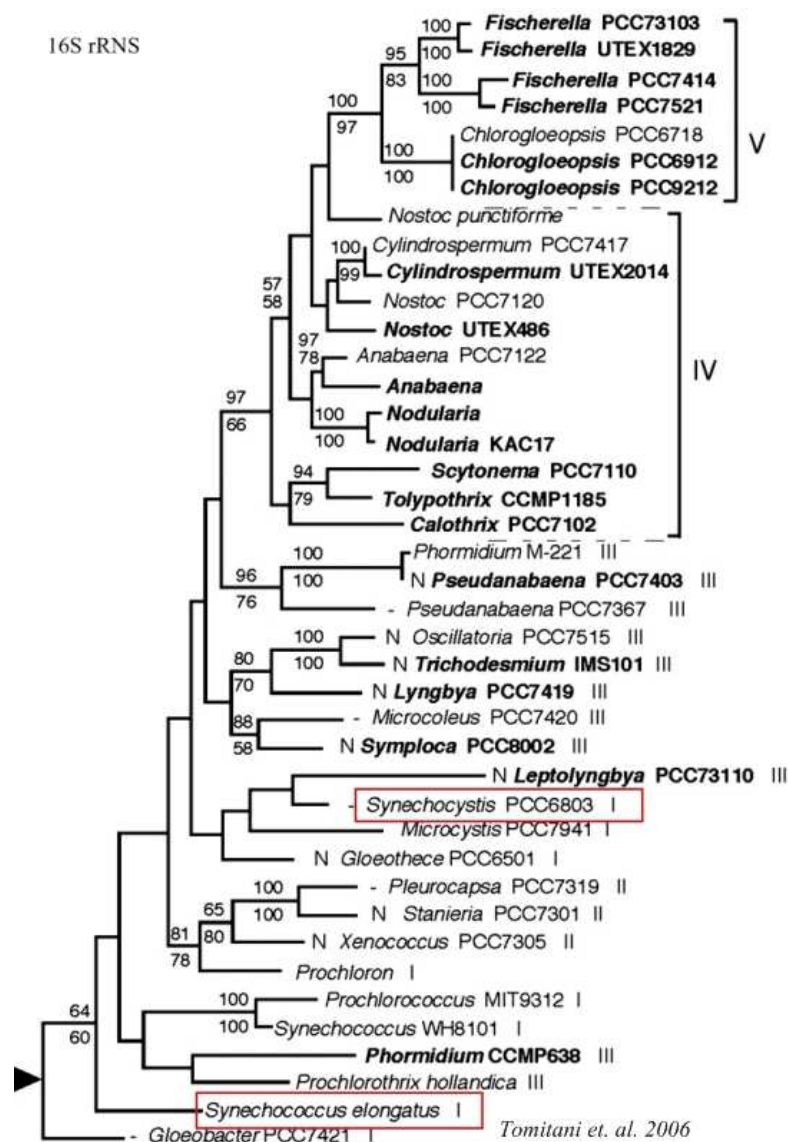
A cianobaktériumok alapvetően monofiletikus, de morfológiai szempontból változatos csoportját alkotják az élővilágnak. A hagyományos morfológiai szempontok figyelembevételével kialakított rendszertan alapján 5 (I-V) alcsoportba sorolják őket.^{7,8} Az I-es alcsoportba (korábban Chroococcales) és a II-es alcsoportba (Pleurocapsales) egysejtű, kokkoid morfológiájú baktériumok tartoznak. A két alcsoport közötti legnagyobb különbség a sejtosztódások eredményeképpen kapott leánysejtek jellemzőin alapul (I: sejtosztódás, II: többszörös sejtosztódás, baeocita képzés). A III-V-ös alcsoportba változatos felépítésű, fonalas cianobaktériumok tartoznak. A III-as (Oscillatoria) alcsoport fonalas fajainak csak egyfajta, vegetatív sejtípusa létezik, de a IV-es (Nostocales) és V-ös (Stigonematales) alcsoport sejtjei képesek morfológiai és szerkezeti szempontból a vegetatív sejtektől különböző, ún. heterocisztákká, melyek az aerob körülmények közötti légköri nitrogén megkötését teszik lehetővé, vagy ún. akinétákká fejlődni, melyek az szélsőséges környezeti feltételek melletti túlélést szolgálják. Ezen túlmenően az V-ös alcsoport fajai között elágazóan fonalas képviselők is találhatóak, melyek a legváltozatosabb és legbonyolultabb többsejtes szerveződések a prokarióták világában.

1. 1. 2. A cianobaktériumok molekuláris rendszertana

A morfológiai osztályozás megtévesztő lehet sok esetben, amikor a különböző csoportok rokonsági foka kérdéses. A modern molekuláris biológia egyik hatásos eszköze a 16S rRNS szekvenciák összehasonlítása alapján történő osztályozás. Korábbi munkák alapján

megállapítható, hogy a baeocita képző törzsek (II), valamint a heterociszta képző és elágazó fonalas szerveződésű alcsoportok (IV, V) valószínűleg egyenes vonalú törzspejlődés eredményei. Ugyanezen törzsek *nifH* és *nifD* (a légköri nitrogén megkötésében szerepet játszó nitrogenáz komplex alegységei) szekvenciák alapján történő besorolása nem támogatta az V-ös alcsoport monofiletikus eredetét, ellenben parafiletikus kapcsolatot mutatott ki a II-es alcsoporttal. Ennek háttérében valószínűleg az áll, hogy a légköri nitrogén megkötő képesség akár laterális géntranszfer útján is terjedhetett az akkori prokarióták között, valamint a kialakult képesség az idők során többször is elveszett különböző törzsekből. Nem minden cianobaktérium képes nitrogén megkötésre, ezért az ebben szerepet játszó gének összehasonlítása nem mindig célravezető.

Közel 20 különböző cianobaktérium törzs 16S rRNS, *rbcL* (a légköri széndioxid megkötésének kulcsenzimét – 1,5-Ribulóz-biszfoszfát karboxiláz/oxigenázt – kódoló gén) valamint *hetR* (heterociszta differenciáció egyik kulcsszerepet játszó génje) szekvenciáinak összehasonlítása tovább finomította a cianobaktériumok törzspejlődéséről eddig alkotott képet.² Ezen vizsgálatok eredményei alapján a fonalas cianobaktériumok sejtdifferenciáció nélküli alcsoportja (III) keveredik az I-es és II-es alcsoport törzseivel, ami a fonalas sejtszerveződés polifiletikus eredetére utal (**1. ábra**).



1. ábra: Különböző cianobaktérium törzsek 16S rRNS szekvenciák összehasonlításából képzett családfája.

Ugyanezen adatsor alapján egyértelmű, hogy az V-ös alcsoport monofiletikus eredetű, törzsfajlódése a IV-es alcsoport heterociszta és akinéta képző, fonalas cianobaktériumok őseiből indul ki. Az *rbcL* és *hetR* gének alapján történő csoportosítás tovább erősíti a

kialakult képet.² Az egysejtű, kokkoid cianobaktériumok (I) ősi eredetére is rámutat a törzsfá, valamint a történeti szempontból legjelentősebb, fotoszintetikus modellként tanulmányozott törzsek a *Synechococcus elongatus* (*Synechococcus* sp. PCC7942, *Anacystis nidulans*) és *Synechocystis* sp. PCC6803 viszonylag távoli rokonsága sem kérdéses. Különösen a *Synechocystis* sp. PCC6803 és *Leptolyngbia* sp. PCC73110 közeli rokonsága meglepő, mivel utóbbi talajlakó, nitrogénfixáló, fonalas cianobaktérium, előbbi pedig egysejtű, édesvízi élőhelyeken megtalálható, a légköri nitrogén megkötésére képtelen törzs (**1. ábra**).

Az egysejtű, nem baeocitaképző cianobaktériumok rendszertani csoportja (Chroococcales) mesterséges csoport. Az ebbe sorolt törzsek (*Synechococcus*, *Prochlorococcus*, *Synechocystis* stb.) morfológiai szempontból nagyon hasonlóak, de 16S rRNS és a fikocianin szintéziséért felelős gének vizsgálata rámutatott az itt található izolátumok egymástól távoli, polifiletikus eredetére.⁹

1. 1. 3. Cianobakteriális kulcsgének és jelentőségük

Az oxigéntermelő fotoszintézis megléte önmagában nem tenné alkalmassá a cianobaktériumokat arra, hogy modellszervezetként szolgáljanak a fotoszintézis folyamatainak általános megértése során. A növények és algák kloroplasztisz genomja által kódolt fehérjék száma átlagosan 5-10%-a a cianobaktériumok genomja által kódolt proteomnak. A cianobaktériumok kódolta fehérjék nagy része eltűnt, vagy átvándorolt az őket endoszimbiózissal bekebelező gazdaorganizmus genetikai állományába. *Arabidopsis thaliana* 24990 nem ismétlődő fehérjeszekvenciájának vizsgálata alapján 1700 olyan génterméket sikerült azonosítani, ami nagy valószínűséggel a bekebelezett és később kloroplasztiszként működő, ősi cianobaktérium genomjából származik. Átvándorlásuk a magasabbrendű, növényi genomba a plasztisz evolúció következményeként fogható fel.¹⁰ A kloroplasztisz kódolta, átlagosan 60-200 fehérje között (15 különféle fajból származó kloroplasztisz genomjának analízise alapján) pedig igen nagy arányban találhatóak olyan szekvenciák, melyek széles körben elterjedtek a jelenleg ismert cianobakteriális genomokban.⁶

Synechocystis sp. PCC6803, *Anabena* PCC7120, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Synechococcus* WH8102, *Prochlorococcus marinus* MED4, *Prochlorococcus marinus* MIT9313, *Nostoc punctiforme* és *Trichodesmium erythraeum* IMS101 genomjainak vizsgálata során (a korábban említett I-V alcsoportok reprezentatív képviselői) 181 olyan gént azonosítottak, melyeknek nem volt megtalálható ortológja más, nem fotoszintetikus baktériumokban. Ezek a kulcsgének olyan egyedülálló tulajdonságokat határoznak meg, melyek kizárólag a cianobaktériumokra jellemzőek az élővilágban.⁶

Csupán 43 gén kapcsolható valamilyen biológiai funkcióhoz ebből a listából. Nem meglepő módon, ebből a szűk csoportból 34 kapcsolódik közvetlenül, vagy közvetve a fotoszintézis biológiai folyamataihoz. A nagy többséget (138/76,2%) hipotetikus génekként ismerjük napjaink legjobban annotált, *Synechocystis* sp. PCC6803 genomjában. További információk alapján a teljes kulcsgén-készlet 46 tagja található meg abban a 434 gént tartalmazó csoportban, melyek ún. interdomén horizontális géntranszfer útján kerültek egymástól evolúciós szempontból távoli organizmusokba.¹¹ Ebből a készletből 45 esetben magyarázható az interdomén géntranszfer a cianobaktériumok és eukarióták között lezajlott endoszimbiotikus eseménnyel, azaz a kloroplasztisz létrejöttével. Ez az eredmény egyértelművé teszi, hogy ez a 45 gén már korai evolúciós stádiumban is széles körben elterjedt volt a cianobaktériumok körében, amikor a ma ismert kloroplasztiszok ősei létrejöttek. A maradék 135 kulcsgén feltételezhetően elveszett, vagy átvándorolt a gazdaszervezet genomjába és jelenleg az *Arabidopsis thaliana* genomján kívül nem írták le őket.¹⁰

Nem csupán az oxigéntermelő fotoszintézis képessége, hanem a fotoszintézis folyamataiban kulcsszerepet játszó gének konzerváltsága (a cianobaktériumok és kloroplasztiszok között) is indokoltá teszi az egysejtű cianobaktériumok modellszervezetként való alkalmazását az oxigéntermelő fotoszintézis vizsgálata szempontjából.

1. 2. *Synechococcus* sp. PCC7942

A *Synechococcus* sp. PCC7942 egysejtű, pálca alakú sejteket képző, Gram(-) cianobaktérium, mely édesvizekben található meg. Mezofil, obligát fotoautotróf cianobaktérium, amely fotoszintetikus pigmentekként klorofillt, karotinoidokat és fikocianobilineket tartalmaz.^{12,13} A fotoszintézis kutatásának történeti szempontjából *Synechococcus* sp. PCC7942 (korábban *Anacystis nidulans* R2) igen nagy jelentőségű. Ez a törzs volt az első olyan cianobaktérium, amely megbízhatóan transzformálható volt idegen DNS segítségével.¹⁴ A genetikai módosíthatóság elengedhetetlen a fotoszintézis pontos biokémiai folyamatainak megismerése szempontjából. Minden technikai, és molekuláris biológiai tapasztalat ellenére az első cianobaktérium, melynek teljes genetikai állományát meghatározták nem ez a törzs, hanem a *Synechocystis* sp. PCC6803 volt, ezzel hosszú időre a legjelentősebb modellszervezetté vált a fotoszintézis tanulmányozásában.¹⁵ Tizenegy évvel később a *Synechococcus* sp. PCC7942 legközelebbi rokonának a *Synechococcus* sp. PCC6301 törzsnek teljes genomszekvenciája is elérhetővé vált.^{16,17}

A *Synechococcus* sp. PCC7942 genomszekvenciája, melyet - a JGI Production Genomics Facility által meghatározott szekvenciák alapján - 2005-ben tettek elérhetővé (NC_007604 hozzáférési kód alatt) szinte teljesen azonos a *Synechococcus* sp. 6301 genomjával. A *Synechococcus* sp. PCC7942 genomja 2695903 bp nagyságú és jelenleg 2662 azonosított, fehérjekódoló szekvenciát tartalmaz (ezek 56%-a azonosított funkcióval rendelkezik). A két törzs közötti legjelentősebb különbség egy 188,6 Kb nagyságú kromoszóma inverzió, melynek végpontjai két feltételezett külső membrán porin fehérje génjét érintik ezzel – feltételezhetően - kialakítva a természetes transzformálhatóság fenotípusát.¹⁷ További két, 52bp és 243bp-os delécióon kívül a két törzs 98-99%-ban azonos genetikai állománnyal rendelkezik. A különbségek leginkább nukleotid polimorfizmusok (inszerciók, deléciók, szubsztitúciók).

A *Synechococcus* sp. PCC7942 kiváló modellszervezet a fotoszintézis tanulmányozása szempontjából. Genomja feltérképezett, egysejtű, transzformálható, viszonylag gyorsan növekedő törzs. Egyetlen hátránya a *Synechocystis* sp. PCC6803-al szemben, hogy obligát

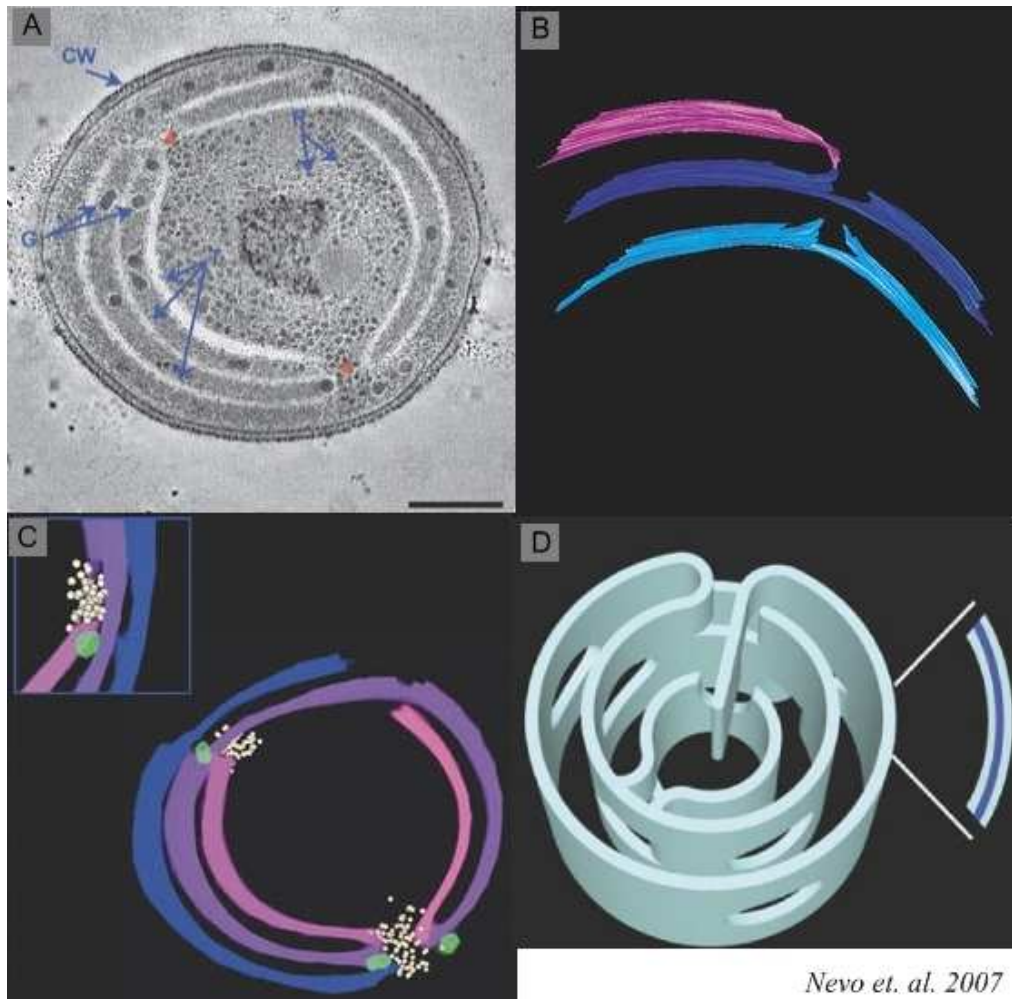
fototróf módon képes csak növekedni, míg az utóbbi képes az ún. fényaktivált fotoheterotróf növekedésre, azaz rövid megvilágítási periódusokat követően fény nélkül, glükóz elsődleges szénforrást használva, heterotróf módon növekedni. Az utóbbi törzs kérdéses filogenetikai pozíciója, valamint különleges morfológiája¹⁸ ellenére is közkedvelt olyan fehérjekomplexek kutatása során, melyek esszenciálisak a fotoszintetikus elektrontranszport szempontjából, de *Synechocystis* sp. PCC6803 esetében mégis lehetséges módosításuk.

1. 2. 1. A *Synechococcus* sp. PCC7942 membránszerveződése

Gram(-) baktériumként a *Synechococcus* sp. PCC7942 törzs is rendelkezik peptidoglikán sejtfallal, külső membránnal és a citoplazmát határoló belső, vagy citoplazmás membránnal. A felsorolt membránokon kívül a *Synechococcus* sp. PCC7942-ben is és a cianobaktériumok többségében megtalálható egy belső, bonyolult felépítésű, ún. tilakoid membránrendszer. A fotoszintetikus elektron-transzport és az ennek eredményeképpen generált protonmotoros erő kialakítása mind a növények kloroplasztiszában, mind cianobaktériumokban az említett lapított, zsákszerű membránképződményeken ún. tilakoid membránokon zajlik.¹⁹ A tilakoid membránokba ágyazva találhatók a fotoszintézis fényreakcióinak fehérjekomplexei és ezekben a membránokban történik a víz bontásából származó elektronok továbbítása is.²⁰ A cianobaktériumok többségében ezek a sejt méretéhez képest hatalmas felszínű membránok - helytakarékosági okokból - koncentrikus lemezekként helyezkednek el látszólag egymástól függetlenül.²¹ Bizonyos cianobaktériumok (pl. *Synechocystis* sp. PCC6803) esetében ettől eltérő morfológia figyelhető meg.¹⁸ *Synechococcus* sp. PCC7942 és *Microcoleus* sp. sejtek ultrastruktúrájának vizsgálata során elektronmikroszkópos tomográfia alkalmazásával bebizonyosodott, hogy az egymástól látszólag független tilakoid membránok több helyen perforációkkal átluggatott, egymással több ponton kapcsolódó, folytonos hálózatot alkotnak és egyetlen, bonyolult szerkezetű központi üreget (tilakoid lumen) vesznek körül sejten belül (**2. ábra**). Gyakran láthatók membránkötött vezikulumok a perforációk körül, melyek a tilakoid membránokba történő, és onnan kiáramló vezikuláris transzport nyomai.²² Közel 500 tomogramm szelet/sejt átvizsgálása nyomán a *Synechococcus* sp.

PCC7942 sejtekben átlagosan 30 tilakoid perforáció található, melyek legalább 3 féle típusúak (egyszerű perforációk, membránbetűródések, lemezek összekapcsolódása). Ezek a pórusok és a vezikuláris transzport jelenléte magyarázatot adhatnak arra hogyan frissülnek fel a tilakoid membránok membrán- és lumenspecifikus fehérjékkel. Mivel a tilakoidok felszíne sűrűn fedett fénybegyűjtő komplexekkel (ún. fikobiliszómákkal) a perforációk környezetén kívül a membrántranszport nehézségekbe ütközhet.²³ A 2D elektronmikroszkópos adatok ellenére a tilakoid membránok nem függetlenek egymástól, hanem a perforációk környékén egymással folytonos kapcsolatba léphetnek (**2. ábra**). Az így létrejövő folytonos, hálózatos szerkezet több szempontból előnyös lehet. A folytonos belső membránrendszer közeget biztosíthat lipidoldékony és vízdoldékony komponensek áramlásának sejten belül, valamint – feltételezések szerint – kialakíthatja és erősítheti a rendszerben található inhomogenitást, aszimmetriát. A fotoszintetikus komplexek dinamikus eloszlása növényi kloroplasztiszokban ismert tény, valamint *Synechococcus sp.* PCC7942 sejtek esetében is kimutatható sugaras aszimmetria, ami a fotoszintetikus komplexek egyenlőtlen eloszlását jelenti a külső és belső tilakoid membránok között.²⁴ A cianobakteriális tilakoidok felsorolt tulajdonságai, szerkezeti elrendeződése a növényi kloroplasztiszok hasonló membránrendszerére is jellemző.²⁰ A kloroplasztiszok és a cianobaktériumok belső membránrendszere sok tekintetben hasonló annak ellenére, hogy maga a membránszerkezet és a fotoszintetikus fénybegyűjtő komplexek között óriási különbségek vannak. A két rendszer evolúciós kapcsolata tükrében egyáltalán nem meglepő az alapvető strukturális sajátosságok ilyen mértékű konzerváltsága.

Figyelemre méltó továbbá a vezikuláris transzport jelenléte ilyen ősi eredetű prokarióta szervezetekben. Ez előrevetíti, hogy az ilyen jellegű membrántranszport evolúciója szempontjából az eukarióta szervezetek dominanciája felülvizsgálatra szorul.



2. ábra: A *Synechococcus sp.* PCC7942 tilakoid membránrendszere és elektronmikroszkópos tomográfia segítségével létrehozott, 3 dimenziós modell. **A:** Perforációk a tilakoid membránrendszerben (vörös nyilak) egy szelet, két-tengelyű elektron-tomogrammon (12nm vastagságban). **B-C:** 6 szelet vastagságú tomogramm alapján készült membránmodellek, melyeken jól láthatóak a tilakoid membránok összeköttetései, valamint a vezikuláris transzport feldúsulása a pórusok környezetében. A C ábra belső ablakában a felső pórus elforgatott, nagyított képe látható. Fehér pontokként riboszómák, zöld foltokként poliszacharid granulomok láthatóak a tilakoid perforáció körül. **D:** Művészi ábrázolás a vizsgált két cianobakteriális törzs strukturális sajátosságait (perforációk, pórusok, betűrődések) felvonultató tilakoid membránrendszeréről. A két tilakoid membránlemezrel határolt, belső tilakoid lumen sötétkek sávként látható a kinagyított részleten. **Jelölések:** CW-sejtfal, mind a belső (citoplazmatikus), mind a külső membrán jól látható; T: Az átluggatott tilakoid membránok; R: riboszómák; G: poliszacharid granulomok. Lépték: **A:** 200nm, a sejt környezetében látható fekete gyöngyök a fókusz beállításához használt aranyrészcsek.

1. 2. 2. A *Synechococcus* sp. PC7942 membránfehérjéi

Három különböző típusú membránban helyezkednek el a *Synechococcus* sp. PCC7942 membránba ágyazott fehérjéi. A három membrántípus funkcionálisan is jól elkülönül. A legkülső membrán, az ún. külső membrán nagy mennyiségben tartalmaz fehérjéket és sejtfal elemeket is, mivel ez a Gram(-) sejtfal egyik magas lipidtartalmú alkotórésze. A cianobakteriális sejtfal részben Gram(-) részben Gram(+) sajátosságokat is mutat.²⁵ Előbbire a külső membrán jelenléte, utóbbira a peptidoglikán réteg vastagsága utal. A külső membránon kívül bizonyos cianobaktériumokban (60 vizsgált törzsből 15 esetben) rendkívül szorosan kapcsolódó fehérjékből, lipopoliszacharidokból felépülő, parakristályos felépítésű ún. S-réteg is elhelyezkedik. Szerepe nem teljesen tisztázott, a sejt védelmén kívül pórusos szerkezete kommunikációt is biztosít a külvilággal. A citoplazmát határoló és a külső membrán közötti tér sűrű, hálózatos felépítésű peptidoglikán sejtfalelemekkel átszőtt ún. periplazmikus tér. A periplazmikus tér és a tilakoid lumen kapcsolatára utalnak vizsgálatok, de egyértelműen nem bizonyított tény.²⁶ A citoplazmás membrán határolta intracelluláris térben helyezkedik el a bonyolult felépítésű tilakoid membránrendszer. Sokkal összetettebb szerkezete ellenére kétdimenziós elektronmikroszkópos felvételeken leggyakrabban 2-4 koncentrikus gyűrűként jelennek meg a tilakoid membránok.

A fehérjék szintézisüket követően ún. transzportrendszerek segítségével szállítódnak rendeltetésszerű helyükre. Az eubaktériumokra jellemző Tat, és Sec rendszerek szignálpeptid „matricákat” ismernek fel a frissen szintetizált fehérjéken. Korábbi vizsgálatok szerint mindkét ismert transzportrendszer jelen van és működik cianobaktériumokban.^{27,28} Az említett rendszereken kívül *Synechococcus* sp. PCC7942 törzsben egy ismeretlen mechanizmusú transzportrendszer is szállítja az oldható fehérjéket a külső membránon kívülre²⁹, valamint a korábban említett vezikuláris transzport biztosítja a membránfehérjék szállítását a tilakoid és citoplazmás membránok között.²²

A cianobaktériumok membránjaiban található fehérjék túlnyomó része a légzési illetve a fotoszintetikus folyamatok kulcsfehérjéi. A tilakoid membránban található fehérjék több mint fele a fotoszintetikus fénybegyűjtés és a fotofoszforiláció folyamataiban vesz részt. Nem csupán membránba ágyazott, hanem membránhoz kötött fehérjék is

szerves részét képezik az említett folyamatoknak. Az egyik legjelentősebb membránasszociált fehérjekomplex az ún. fikobiliszóma. A fikobiliszóma tartalmazza a cianobaktériumokra leginkább jellemző fikobilin kromofór tartalmú fehérjéket (fikobiliproteinek), melyek sokalegységes, leggyakrabban félgömböszerű komplexei fontos fénybegyűjtő funkcióval rendelkeznek.

1. 2. 2. 1. A sejtfal és a külső membrán fehérjéi

Izolált sejtfalakon, valamint küldő membránokon végzett tanulmányok szerint a *Synechococcus sp.* PCC7942 sejtfala nagyon hasonló más Gram(-) baktérium sejtfalhoz. Izolált majd szolubilizált sejtfalak fehérjetartalma 35 gélelektroforézissel azonosítható fehérjét tartalmazott. A sejtfal többi komponense pedig a tipikus bakteriális sejtfal összetevőit tartalmazta.³⁰ A sejtfalban továbbá a cianobaktériumok többségére jellemző karotinoidkötő fehérjék (P35) is megtalálhatóak, melyek nagy mennyiségű karotinoid megkötésével valószínűleg a nagy intenzitású fénytől óvják a sejtet.²⁴

Korábbi mérések *Synechococcus sp.* PCC7942 külső sejtfalrendszerének összetételét vizsgálták vaslimitált körülmények között. A vaslimitáció gyakori fiziológiai állapot a cianobaktériumok természetes élőhelyein. Vaslimitáció során jellemző változáson megy keresztül mind a sejtek ultrastruktúrája, mind a fiziológiája. Az addig 2-4, a citoplazmás membránnal párhuzamosan megjelenő tilakoid membránok száma lecsökken 1-re, valamint fehérje összetételük is jelentősen megváltozik. A sejtfal külső membrán frakciójában azonosított változások olyan fehérjék indukált megjelenésére utalnak, melyek a vas homeosztázis fenntartásáért felelnek.³¹ A sejtfal és a sejtfalban található külső membrán tehát aktív részese a sejt környezethez való alkalmazkodásának.

Synechocystis sp. PCC6803 izolált, külső membránjaiban 49 féle protein nyomait sikerült azonosítani 2D-gélelektroforézis és tömegspektroszkópiai vizsgálatokkal.³² Az azonosított fehérjék között találunk porinfehérjéket, ABC transzportrendszerek komponenseit, szénhidrátok exportjért felelős fehérjéket (GumB), pílus komponenseket. A modern proteomikai módszerek is alátámasztják tehát a sejtfal aktív szerepvállalását nem csak a sejtek védelmében, hanem a külvilággal történő kommunikációban is.

1. 2. 2. 2. A citoplazmás membrán fehérjéi

Elektronmikroszkópos módszerekkel évtizedek óta vizsgálják a cianobaktérium sejtek belső szerkezetét. A legáltalánosabb módszerek kémiai fixálást használnak (glutáraldehid), ami viszont jelentősen roncsolja a sejt szerkezetet és rontja a képek felbontását is. Az egyik legfejlettebb elektronmikroszkópos képalkotás („freeze substitution”) és az immunocitokémia ötvöztetésével további részletek láttak napvilágot az ismert fehérjék lokalizációját tekintve. Immunhisztokémiai („immuno-gold”) eljárásokkal 10 féle ismert membránfehérje intracelluláris helyzetét határozták meg *Synechococcus sp.* PCC7942 esetében.²⁴

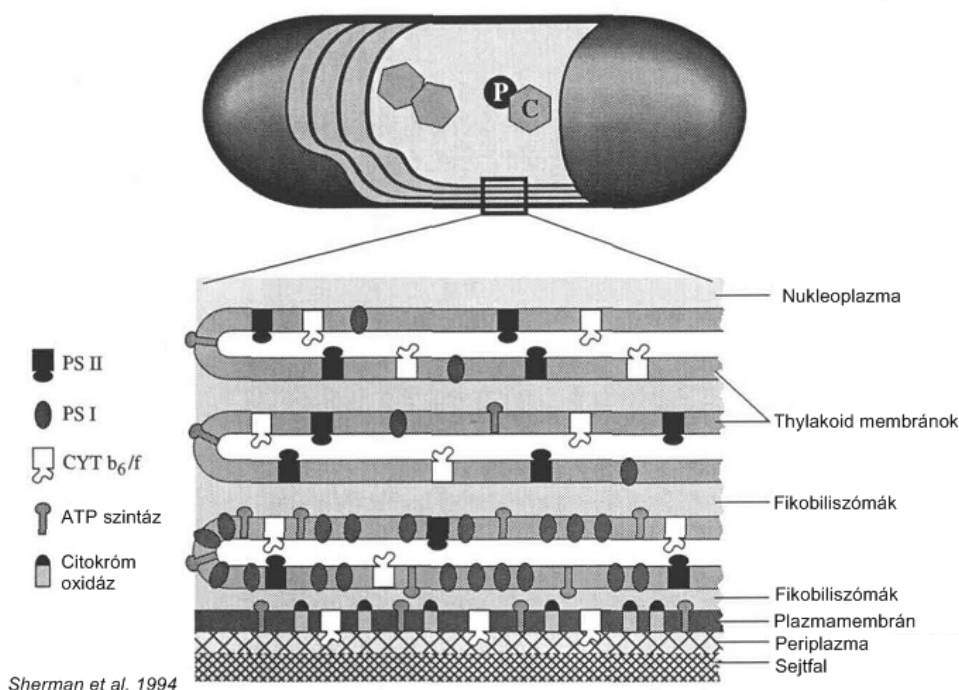
A citoplazmás membránban helyezkednek el a légzési elektrontranszportlánc fehérjéi. Ebben a membránban azonosíthatóak voltak a citokróm oxidáz, a citokróm b_6/f komplex, valamint az ATP-szintáz fehérjekomplexei. Az „immuno-gold” adatok alapján, valamint izolált, fixált membránokon végzett vizsgálatok szerint az ATP-szintáz és a citokróm oxidáz ellenanyag legerősebben a citoplazmás membránnal reagált. Izolált külső és a tilakoid membránokkal sokkal kevésbé mutattak reakciót megerősítve a lokalizációs kísérletek eredményeit, melyek szerint legnagyobb mennyiségben a citoplazmás membránban, valamint a külső tilakoid membránokban találhatóak meg. Ez az eredmény előre vetíti, hogy a citoplazmás membránban a megfelelő fehérjék részvételével teljes légzési elektrontranszport zajlik (**3. ábra**).

1. 2. 2. 3. A tilakoid membránok fehérjéi

Cianobaktériumokban az oxigéntermelő fotoszintézis és a légzés bizonyos folyamatai a tilakoid membránokban zajlanak. Számos vizsgálat irányult ezeknek a membránoknak a minél pontosabb izolálására és fehérje összetételük meghatározására. A tilakoid membránok domináns fehérjekomponensei a fotofoszforiláció rendszerének komponensei. A tilakoidban megtalálható fehérjék közel felét az I-es és II-es fotokémiai rendszer komplexei (PSI, PSII) és a Citokróm b_6/f komplexei teszik ki. Növényi kloroplasztiszokban ezen komplexekhez kapcsolódó fénybegyűjtő rendszerek is jelentős részét képezik a tilakoid membránok fehérjetartalmának (LHCI, LHCII).³³

Cianobaktériumok esetében a tilakoid membránok sejten belüli szerkezete jelentős eltéréseket mutat a növényi kloroplasztiszokétól annak ellenére, hogy főbb tulajdonságaik

megegyeznek. A fő fénybegyűjtő rendszer nem membránba ágyazott, hanem a tilakoidhoz lazán kötődő fikobiliszómák végzik el ezt a feladatot.¹³ A fotoszintetikus elektrontranszport fehérjéin kívül a légzési lánc bizonyos komponensei is megtalálhatóak a tilakoid membránokban. *Synechococcus* sp. PCC7942 cianobaktérium esetében az említett komplexek sugarasan, asszimetrikusan oszlanak meg a keresztmetszeti képen koncentrikus körökként látszó tilakoidok között. A PSI főleg a legkülső tilakoid membránban dúsul fel az ATP-szintázal együtt. Ezt az eloszlást főleg immuncitokémiai, és elektronmikroszkópos eredmények támasztják alá.²⁴ A PSII és a Citokróm b_6/f komplexek eloszlása sokkal egyenletesebb a tilakoid membránokban.



3. ábra: Sematikus ábrázolása a *Synechococcus* sp. PCC7942 belső membránrendszerének, és a különböző membránokban található fehérjék eloszlásának. A membránok által határolt térben, a nukleoplazmában találhatóak meg a légköri széndioxid megkötésében résztvevő karboxiszómák (C), valamint az elektronmikroszkópos képeken gyakran látható foszfát granulumok (P). A citoplazmás membránba ágyazva teljes légzési elektrontranszport rendszert találunk, valamint a PSI és ATP-szintáz komplexek feldúsulnak a plazmamembránhoz közeli, legkülső tilakoid membránokban. Az egyszerűség kedvéért a csak a fikobiliszómák helyét jelölték a tilakoid membránok közötti térben.

A fotoszintetikus apparátus jellemző fehérjéin kívül a sejtben található karotinoidok szintéziséért felelős enzimek³⁴, a nitrogén metabolizmus enzimjei²⁶ és a lipid (zsírsav) anyagcsere meghatározó fehérjei is a tilakoid membránokban helyezkednek el.^{35,36}

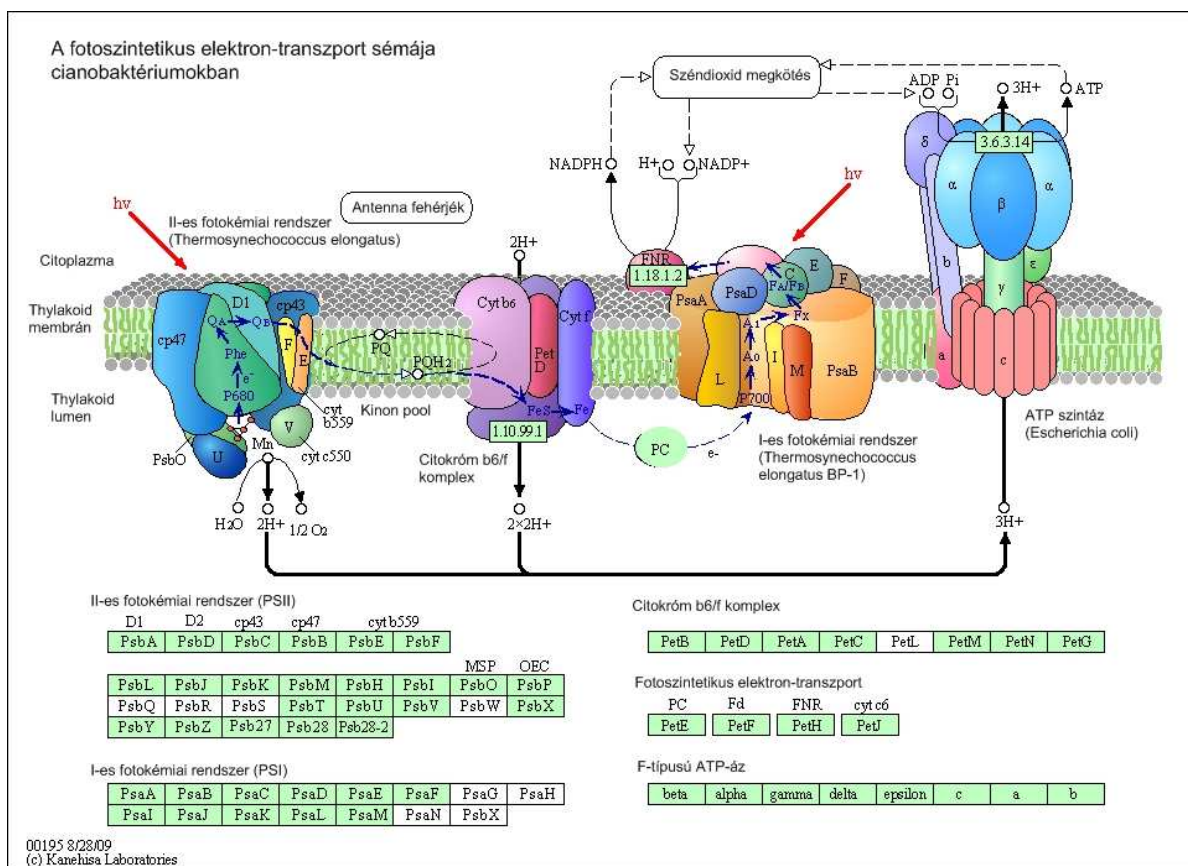
1. 2. 2. 3. 1. A fotoszintetikus elektrontranszport lánc

A fotoszintézis fényfüggő folyamatainak legfontosabb lépései a fényenergia kémiai energiává történő átalakításának lépései (fotofoszforyláció). Az ebben a folyamatban résztvevő fehérjék a fénybegyűjtő fikobiliszóma, a PSII, PSI, Citokróm b_6/f és az F-típusú ATP-szintáz komplexei, melyek membránba ágyazva helyezkednek el a tilakoidban. A fotofoszforyláció folyamatait membránasszociált, valamint vízzoldékony fehérjék is meghatározzák (ferredoxin, plasztocianin/citokróm c_6).

A legfontosabb lépések ebben a folyamatban a fényindukált töltésszétválasztás eseményei, melyek a PSII és PSI reakciócentrum klorofill molekuláin történnek meg. Időben szétválasztott történések alapján az első lépés a PSII reakciócentrum klorofill dimer (P680) gerjesztődése. Ebben a folyamatban a fikobiliszómák a nem 680nm hullámhosszon érkező fotonok energiáját is képesek a P680-ra csatornázni melyek segítségével megtörténik a fényindukált töltésszétválasztás a $P680^+$ és $Pheo^-$ között. Ezt követően a gerjesztő foton energiájának felhasználásával a gerjesztett elektron a PSII belső elektrontranszport-komponensein keresztül ($P680 > Pheo > Q_A > Q_B$) adódik a tilakoid membránban oldott formában elhelyezkedő, hidrofób plasztokinon molekulákra („kinon pool”). A PSII belső elektrontranszport láncában egy stabilan kötött kinon (Q_A) és egy lazán kötött kinon (Q_B) játszik szerepet az elektronok továbbításában. Utóbbi a citoplazmából származó két proton és a Q_A -tól származó 2 elektron felvételével alakul redukált plasztokinollá, disszociál a PSII-ről és a tilakoid membránba távozik. Helyét egy a tilakoid membránból származó oxidált plasztokinon molekula veszi át, majd ciklus megismétlődik. A P680 elvesztett elektronjának pótlása a PSII vízbontó komplexében elektrondonorként protonokra, elektronokra valamint oxigénatomokra hasított vízmolekulákból valósul meg. Eközben protonok és molekuláris oxigén szabadulnak fel. Egy molekula oxigén felszabadulásához a gerjesztett $P680^+$ -nak 4 elektront kell elvonnia a tirozin Y_Z aminosav

oldalláncon keresztül két vízmolekulától, miközben 4 proton is keletkezik. A víz bontásából származó protonok a tilakoid lumenben halmozódnak fel.³⁷ A membránban oldott, redukált plasztokinol molekulákról az elektronok további útja potenciáljuknak megfelelően a Citokróm b_6/f komplex vas-kén kockáin keresztül a vízdékony plasztocianin (citokróm C_6) molekulákra vezet, melyek a tilakoid lumenben, oldott formában helyezkednek el. A citokróm b_6/f komplex maga is aktívan részt vesz a protonok citoplazmából (növényekben sztróma) a tilakoid lumenbe juttatásában a redukált plasztokinol molekulák oxidálásával.³⁸

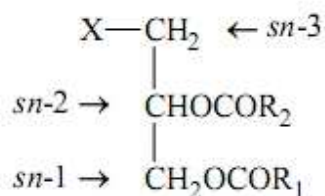
Az említett folyamatokkal egyidőben a PSI reakciócentrumban is megtörténik a fényindukált töltésszétválasztás a gerjesztett $P700^*$ és az első elektronakceptor klorofill (A_0) között, mely oxidált $P700^+$ és redukált A_0^- képződéséhez vezet. A PSI reakciócentrum-klorofill molekuláról ($P700$) az elektron a PSI belső elektrontranszport-komponensein keresztül ($P700 > A_0 > A_1 > F_x > F_a/F_b$) a szolubilis ferredoxin molekulára kerül ahonnan a ferredoxin- $NADP^+$ -oxidoreduktázon (FNR) keresztül a végső elektronakceptor $NADP^+$ -ra jut. A $P700$ leadott elektronja a lumen felől, a plasztocianin (citokróm C_6) molekulákról pótlódik és a ciklus ismétlődik.³⁷ A folyamat során, melyet lineáris elektrontranszportnak neveznek protonok halmozódnak fel a tilakoid lumenben, amely elektrokémiai potenciálkülönbséget (pozitív töltéssel a lumenben), valamint protongradienst, azaz protonkoncentráció különbségében tárolt, kémiai potenciálkülönbséget alakít ki a citoplazma és a tilakoid lumen között. Ez protongradiens a membránba ágyazott, F-típusú ATP-szintázokon keresztül egyenlítődik ki folyamatos ATP termelése közben **(4. ábra)**.³⁹



4. ábra: A cianobakteriális fotofoszfóráció sematikus ábrája, és a folyamatban résztvevő komplexek alegységeinek elnevezése.

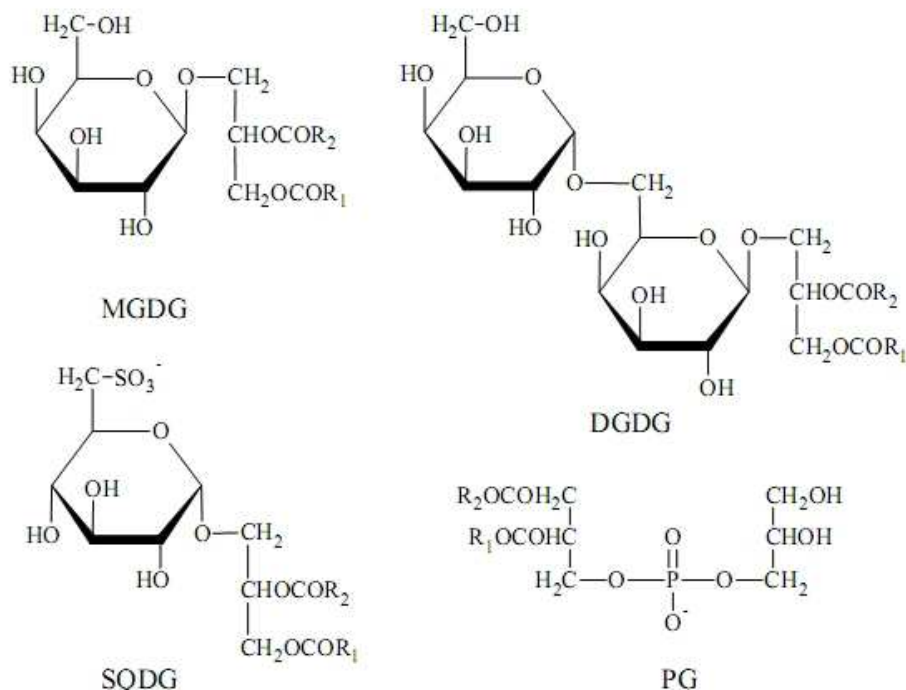
1. 3. A *Synechococcus* sp. PCC7942 membránok lipidösszetétele

A biológiai membránok legjellemzőbb alkotóelemei foszfolipidek és glikolipidek. Ezen molekulák hidrofób részének jellemzői alapján glicerolipid, szfingolipid és a szteránvázat tartalmazó szterol-lipidek a legelterjedtebb membránalkotók. Baktériumok, állatok és növények kloroplasztiszon kívüli membránjainak túlnyomó része foszfoglicerolipidekből épül fel (**5. ábra**).



5. ábra: A glicerolipidek felépítése. A glicerín molekula ún. sn-1 és sn-2 pozíciót apoláros zsírsavak észterezik. Az sn-3 pozícióba a poláris fejcsoport kötődik.

A cianobaktériumok ettől lényegesen eltérő, jellemzően konzervált lipidösszetétellel rendelkeznek. A többi baktériumtól eltérően, melyeknek membránjaiban dominálnak a foszfoglicerolipidek a cianobakteriális membránok főleg glikoglicerolipidekből építkeznek és egyetlen foszfolipidként foszfatidilglicerint (PG) tartalmaznak. Glikoglicerolipidekből – molszázalékokban kifejezve - a semleges galaktolipid MGDG (monogalaktozil-diacilglicerol) közel 50%-ban, a DGDG (digalaktozil-diacilglicerol) 30%-ban, valamint negatív töltésű szulfolipidként SQDG (szulfokinovozil-diacilglicerol) 5%-ban, foszfoglicerolipidek közül egyedülként a foszfatidilglicerin 10%-os arányban fordul elő a fotoszintézis szempontjából legfontosabb, tilakoid membránokban (**6. ábra**). Ez a fajta lipidösszetétel főleg az oxigén termelő fotoszintézist végző cianobaktériumokra, az algákra (melyekben jellemzően magasabb az SQDG aránya) és a növények kloroplasztiszaira jellemző.³⁵ A *Synechococcus sp.* PCC7942 sejtek membránjai MGDG-ből 54%-ot, DGDG-ből 16%-ot, SQDG-ből 11%-ot és PG-ből 19%-os mennyiséget tartalmaznak.⁴⁰



6. ábra: Cianobaktériumok glicerolipdjei. DGDG: digalaktozil-diacilglicerin, MGDG: monogalaktozil-diacilglicerin, PG: foszfatidil-glicerin, SQDG: szulfokinovozil-diacilglicerin; R₁ és R₂: acilsoportok

1. 3. 1. Neutrális glikoglicerolipidek a fotoszintetikus membránokban

A neutrális (állandó töltéssel nem rendelkező) glikoglicerolipidek főként oxigéntermelő fotoszintetikus élőlények tilakoid membránjának fő szerkezeti lipidjei. A két legelterjedtebb galaktolipid (MGDG, DGDG) szerkezeti, és funkcionális szempontból is nagyon hasonló szerepet tölt be cianobaktériumokban és növényi tilakoid membránokban egyaránt. A megfelelő arányú és szerkezetű galaktolipid tartalom befolyásolja a membránokban „kettősréteg”-„nem-kettősréteg” szerkezeti alegységek előfordulását.⁴¹ Az MGDG, mely egyetlen cukormolekulát tartalmaz fejcsoportként az ún. nem-kettősréteg képző lipidek csoportjába tartozik, míg DGDG és az SQDG az ún. kettősréteg képző csoportba tartoznak, a PG-vel együtt. A két különböző lipid csoport aránya tehát erősen befolyásolja az általuk alkotott membránok fizikai tulajdonságait. A lipidek acil oldalláncainak telítettségi foka a másik legjelentősebb tényező, amely befolyásolja a

membránok fizikai paramétereit, de ebben a növények és a cianobaktériumok (egymás között is) nagy változatosságot mutatnak.⁴²⁻⁴⁰ Mindezek a fizikai paraméterek nem magyarázzák meg, hogy a fotoszintetikus membránokban található glikolipidek miért főleg galaktózmolekulákat tartalmaznak glükózmolekulák helyett. A galaktoglicerolipidek ilyen nagyarányú elterjedtsége az oxigéntermelő fotoszintézist végző élőlények között nem magyarázható csak filogenetikai szempontból, hanem funkcionális tulajdonságaik is fontossá teszik jelenlétüket (nem oxigén termelő fotoszintézist végző organizmusok esetében messze nem ilyen elterjedtek).⁴³

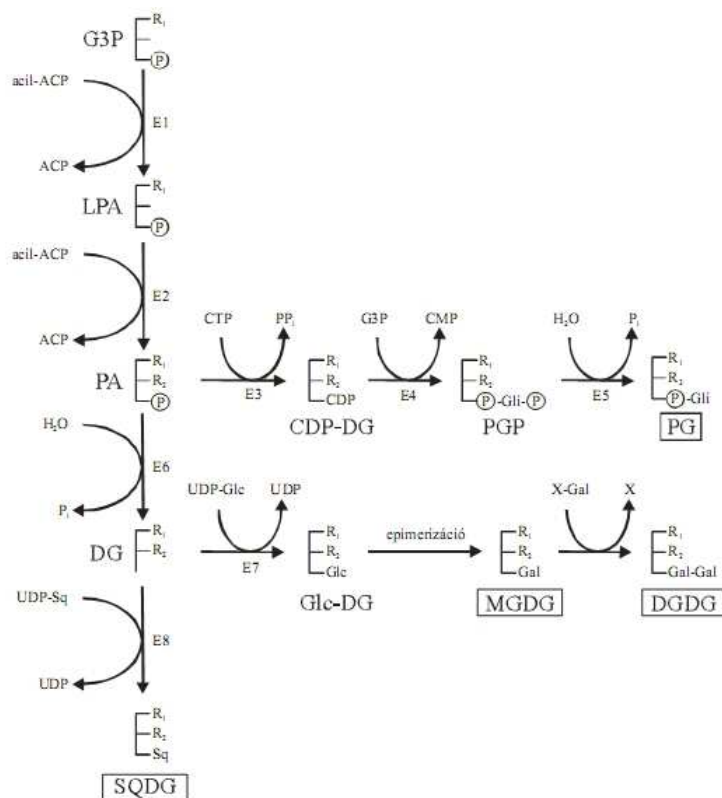
MGDG esetében a galaktóz fejcsoport sn-3 pozícióban kötődik a diacilglicerín molekulához β -kötéssel. A DGDG molekulára egy további, végső α -galaktózmolekula is ráépül α Gal(1-6) β Gal formában. Fotoszintetikus membránokban a monogalaktozil és digalaktozil fejcsoportok konzerváltak, a galaktolipidek között ugyanakkor az sn-1 és sn-2 pozícióban észterestítő zsírsavmolekulák hossza és telítettségi állapota (kettős kötések pozíciója, és száma tekintetében) rendkívüli változatosságot mutat, és dinamikusan változik a környezethez való adaptáció során (**6. ábra**).

1. 3. 1. 1. A galaktolipidek bioszintézise

Növényekben a galaktolipid bioszintézis helye a kloroplasztisz ún. „envelop” membránja. Perkurzoraik azonban nem mindig plasztisz eredetűek. Az újonnan szintetizálódó galaktolipidek a tilakoid membránokba szállítódnak, valamint bizonyos növekedési körülmények között akár a kloroplasztiszon kívülre is eljuthatnak (foszfátéhezés). A növényi galaktolipid bioszintézis tehát az intracelluláris organellek közötti összehangolt transzportfolyamatokra támaszkodik.

Az MGDG szintézis első lépéseként egy galaktozil csoport kerül diacil-glicerín (DAG) sn-3 pozíciójára. Ezt a lépést egy MGDG szintáz enzim katalizálja, mely uridin difoszfógalaktózt használ szubsztrátként. Második lépésként a kötött α -galaktozil csoport β -galaktozil fejcsoporttá izomerizálódik. A DGDG szintézise folyamán galaktozil transzferáz enzimek (DGD1, DGD2) további glikozilációs lépéseket katalizálnak, melyek eredménye a DGDG, valamint különféle oligo-galaktoglicerolipidek lehetnek. Ezek az enzimek MGDG-t használnak szubsztrátként.⁴⁴

A növények kloroplasztisának és a cianobaktériumok lipidösszetétele nagyon hasonló, azonban a galaktolipid bioszintézis markáns különbségeket mutat (7. ábra). A szintézis első lépése nem az MGDG termelődése DG-ből és UDP-galaktózból, hanem radioaktív jelölések alapján egy másik glikolipid, a monoglükozil-diacilglicerin (Glc-DG) szintézise UDP-glükóz felhasználásával.⁴⁵ Egy második, epimerizációs lépés során jön létre az MGDG.⁴⁶ A monoglükozil-diacilglicerin aránya nem éri el az 1%-ot a cianobakteriális membránokban, viszont különböző környezeti feltételek mellett akár akumulálódhat is (12%)⁴⁷. A Glc-DG szintéziséért felelős enzimet komparatív genomikai módszerekkel azonosították ugyan, de az epimerizációs lépést egy máig ismeretlen enzim katalizálja.⁴⁵ A DGDG szintézise során egy galaktózil csoport kerül az MGDG-re. *Synechocystis* sp. PCC6803 esetében a DGDG szintéziséért felelős *dgdA* gén kiütése nem okozott jelentős változásokat.^{48,49}



7. ábra: A lipidek bioszintézise cianobaktériumokban.

1. 3. 1. 2. A galaktolipidek szerepe fotoszintetikus membránokban

A lipidek elsődleges feladata egy biológiai membrán esetében a kettős lipidréteg struktúra kialakítása és fenntartása. A membrán fizikai tulajdonságai a „kettősréteg” és nem-kettősréteget formáló lipidek arányától, ezek telítetlenségi fokától, valamint a membrán fehérje összetételétől nagymértékben függ. Cianobaktériumokban és a növényi kloroplasztiszok tilakoid membránjában az egyetlen nem-kettősréteget formáló lipid az MGDG. Növényekben a plasztiszon kívüli membránokban a foszfatidil-etanolamin (PE) és kardiolipin (CL) rendelkezik hasonló tulajdonságokkal, azonban ezek a lipidek nem találhatók cianobaktériumokban.⁴³

A membránban található lipidek specifikus kapcsolatban lehetnek fehérje komplexekkel.^{50,51,52} A galaktolipidek szerepét leginkább növényi modelleken tanulmányozták. *Arabidopsis* mutánsokban a DGDG és MGDG lecsökkent mennyisége növekedési problémákat okozott, megváltoztatta a kloroplasztisz tilakoid membrán szerkezetét, gátolta a klorofill termelődését, valamint a fotoszintetikus elektrontranszport hatékonysága csökkent.^{53,54} A galaktolipidek előfordulása fotoszintetikus komplexekben, valamint elterjedtségük más glikoglicerolipidek rovására egyértelmű jele specifikus szerepüknek az oxigén termelő fotoszintézis folyamataiban. A fejcsoport minőségének fontosságára rámutatott az is, hogy mesterségesen megváltoztatott glikolipid összetétel esetén, transzgenikus, lecsökkent DGDG mennyiséget tartalmazó *Arabidopsis* mutánsban sikerült néhány hatást kompenzálni. Ebben a mutánsban *Chloroflexus auranticus*-ból származó glükóziltranszferázt expresszáltattak DGDG szintézisében zavart háttéren. A felhalmozódó glükózilgalaktozil-diacilglicerin hatására a mutáns növekedési problémái megszűntek, viszont a gátolt klorofill szintézist és a lecsökkent hatékonyságú fotoszintézis hatását nem sikerült teljesen komplementálni.^{55,56} Mindezek a tények arra utalnak, hogy specifikus és funkcionális tulajdonságaik révén a galaktolipidek elsődleges fontossággal bírnak fotoszintetikus membránokban.

1. 3. 2. Anionos glicerolipidek fotoszintetikus membránokban.

Az anionos foszfatidilglicerin (PG) és a foszfort nem tartalmazó szulfokinovozil-diacilglicerin (SQDG) a tilakoid membránok alacsony mennyiségben megtalálható (kettősréteget képző) komponensei, melyek negatív töltéseket biztosítanak a kettős membránoknak. Az SQDG kizárólag a növények és algák kloroplasztizának tilakoid membránjában található, míg a PG más eukarióta és prokarióta membránokban is megtalálható komponens. A növényi tilakoid membránokban, a kloroplasztizok belső burkolómembránjában („envelop”) és a cianobakteriális sejtmembránokban azonban a PG az egyetlen foszfoglicerolipid.³⁵ A fotoszintézis helyszínéül szolgáló membránok hatalmas felületűek, létrehozásukkor a növényi és a cianobakteriális sejtek a lehető legkevesebb foszfát felhasználására törekednek, hiszen a leggyakrabban előforduló tápanyaglimitáció a foszfátéhezés.⁵⁷ Foszfátéhezés során a növényi sejtekben található foszfolipidek jelentős része kicserélődik glikoglicerolipidekre.⁵⁸ Leggyakrabban az SQDG és a DGDG mennyisége növekedik a normális érték fölé, ezzel a sejt jelentős mennyiségű foszfátot takarít meg más folyamatok számára. Foszfátéhezés során a membránok lipidösszetétele úgy változik meg, hogy a PG és SQDG által meghatározott összes negatív töltés mennyisége állandó marad. Ez arra utalhat, hogy az SQDG képes bizonyos mértékben helyettesíteni a PG szerepét a fotoszintetikus membránokban.⁵⁹

1. 3. 2. 1. A PG és az SQDG bioszintézise

A PG bioszintézise mind prokariótákban, mind eukariótákban hasonló módon zajlik. Foszfatidsav intermediereken keresztül CTP felhasználásával keletkezik citozin 5'-difoszfát (CDP)-diacil-glicerin. Ezt a folyamatot a *cdsA* gén kódolta enzim a CDP-diglicerin-szintáz katalizálja. Ez a fehérje 8 transzmembrán régióval rendelkező membránfehérje, *Escherichia coli* baktériumban régóta ismert kulcsenzime a foszfoglicerolipidek szintézisének.⁶⁰ Ezt követően CDP-diacil-glicerinen található CDP-fejcsoprotot a *pgsA* gén kódolta foszfatidilglicerin-foszfat-szintáz enzim cseréli le foszfatidil

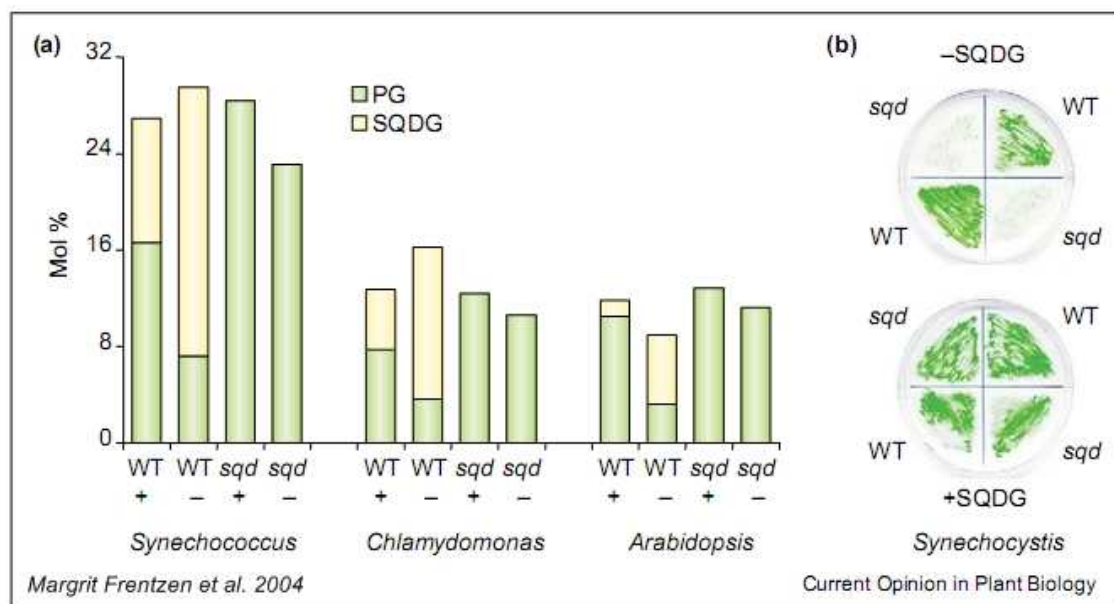
csoportra. A PgsA fehérje szintén membránfehérje, mely *E. coli* esetében a citoplazmás membránban található meg.⁶¹ A keletkező foszfatidilglicerín-foszfát (PGP) a foszfatidilglicerín-foszfát-foszfátáz enzim segítségével alakul végső formájába (**7. ábra**). A végső lépést katalizáló enzimet eddig csak *Anabena* sp. PCC7120 cianobaktériumban sikerült azonosítani.⁶² *Arabidopsis thaliana* esetében két gén (*PGP1* és *PGP2*), legalább három féle izoenzimet kódol, melyek különböző kompartmentekben felelősek a PG szintéziséért. Mindkét gén a magban kódolt, de fehérjeszinten a *PGP2* felelős a mikroszóma frakcióban, a *PGP1* pedig a kloroplasztisz „envelop” és a mitokondrium belső membránjában megtalálható enzimaktivitásért. A *PGP1* és *PGP2* gének magas homológiát mutatnak a bakteriális *pgsA* génekkel, de erősen különböznek az emlős és élesztő mitokondriumokban található foszfatidilglicerín-szintázok génjeitől.⁶³ *Arabidopsis thaliana* részlegesen inaktivált, *PGP1* mutáns vizsgálata során kiderült, hogy *PGP1* kódolta enzim esszenciális a kloroplasztiszban található PG szintézisében, ugyanakkor a mitokondriális PG mennyisége nem változott a mutáció hatására, feltehetően az ER-ben szintetizálódó PG transzportja miatt (*PGP2*).⁶⁴

Növényi sejtekben az SQDG egyedül a kloroplasztiszban szintetizálódik. Első lépésként a bakteriális *sqdB* homológ *SQD1* kódolta uridin 5'-difoszfát (UDP) szulfokinovóz szintáz enzim egy aktivált cukorszármazékot készít UDP-glükózból és szulfid ionból.⁶⁵ Az így keletkezett szulfokinovozil csoportot a bakteriális *sqdX* homológ *SQD2* kódolta SQDG-szintáz UDP-szulfokinovózzal diacil-glicerinre (DG) mozgatja (**7. ábra**).⁶⁶ A glikoziltranszferáz enzim nagy változatosságot mutat növények, és prokarióták között, viszont a szulfokinovóz cukorszármazék termelődése, és az ezért felelős enzim széles körben konzervált.⁶⁷

A kloroplasztiszban található PGP-szintáz csak az ugyanott termelődő CDP-diacilglicerint használja szubsztrátként, azonban az SQDG szintázok a növényi sejt különféle eredetű DG molekuláit is felhasználják. Valószínűleg ennek köszönhető, hogy foszfátéhezés során a növényi sejtek nagyon gyorsan képesek alkalmazkodni felhasználva a kloroplasztisz és a kloroplasztiszon kívüli foszfolipidek bontásából származó DG-t. Az ilyen módon termelődő neutrális glikoglicerolipidek, valamint az SQDG jelentős szereppel bírnak a foszfátéhezés során végbemenő fiziológiai válaszreakciókban.⁶⁸

1. 3. 2. 2. Az SQDG és PG szerepe fotoszintetikus membránokban

A PG és SQDG fiziológiai szerepét számos mutánsban vizsgálták. Az SQDG bioszintézisében mutáns *Arabidopsis*⁵⁸, *Synechococcus* sp. PCC7942^{69,66} és *Synechocystis* sp. PCC6803⁶⁹, *Chlamydomonas reinhardtii*⁷⁰, *Rhodobacter sphaeroides*⁶⁵ modellszervezetek tanulmányozása során egyértelmű, hogy a töltéssel rendelkező lipidek elengedhetetlen komponensei a tilakoid membránoknak a fotoszintézis folyamatainak szempontjából. Különösen fontos a két anionos lipid egymást helyettesítő képessége foszfátéhezés során. Mutánsok melyek SQDG szintézisében zavart szenvednek (sqdB/SQD1, sqdX/SQD2) megemelkedett PG mennyiséggel kompenzálni tudják az SQDG hiányát ennek megfelelően nem mutatnak jelentős növekedési problémákat egészen addig, amíg foszfátlimitáló körülmények közé nem kerülnek. Foszfátéhezés során az eredeti SQDG tartalom megemelkedik, és képes kompenzálni a lecsökkent foszfolipid hiánya miatt kialakuló problémákat.⁶⁵ Ugyanakkor az SQDG hiányát megemelkedett PG mennyisége képes kompenzálni *Synechococcus* sp. PCC7942, *C. reinhardtii* és *Arabidopsis thaliana* mutánsok esetében.^{69,66} Ez a megemelkedett PG mennyiség nem csökken le jelentősen foszfátéhezés során, de a mutánsok esetében a foszfáthiány negatív hatásai korábban jelentkeznek, mint a megfelelő vad típusok esetében. Az adatok alapján egyértelmű, hogy a tilakoid membránokban az összes negatív töltés mennyisége (melyet az SQDG és PG együtt határoz meg) finoman szabályozott egyensúlyra törekszik (**8. ábra**). *Synechocystis* sp. PCC6803 esetében az sqdB/sqdX génekben történő mutációk letálisnak bizonyultak, ami rámutat a különböző anionos lipidek eltérő fontosságára még a cianobaktériumokon belül is.⁶⁷



8. ábra: SQDG szintézisében mutáns *C. reinhardtii*, *Arabidopsis thaliana*, *Synechococcus* sp. PCC7942 és *Synechocystis* sp. PCC6803 törzsek lipidösszetétele, és növekedési fenotípusa normál, illetve foszfát limitáló körülmények között a megfelelő vad típusokkal összehasonlítva. **(a)** A mutáns sejtek és levelek PG és SQDG százalékos előfordulási aránya az összlipidre vonatkoztatva normál (+) körülmények és foszfátéhezés (-) során. **(b)** A mutáns sejtek növekedése agar lemezeken 20uM SQDG (SQDG+) jelenlétében, illetve nélküle (SQDG-).

Arabidopsis thaliana *SQD1/SQD2* mutánsától eltérően kloroplasztisz PG szintéziséért felelős *PGP1* génben bekövetkező mutációk súlyos következményeket okoznak még normál növekedési körülmények között is.^{64,68} A *PGP1* génben pontmutációt hordozó *PGP1-1* mutáns *Arabidopsis thaliana* esetében a kloroplasztisz PG tartalma mindössze 20%-kal csökken. Ez a különbség elegendő ahhoz, hogy a mutáns tilakoid membránok súlyos szerkezeti károsodást szenvedjenek, valamint ezekben a tilakoid membránokban található PSII fotoszintetikus aktivitása jelentősen csökkenjen.⁷¹ Ugyanezen gén deléciós mutáns változatából (T-DNS inszerció) teljesen hiányzik a plasztisz eredetű PG. Ez a mutáns nem képes fotoautotróf módon fejlődni, növekedéséhez cukorforrásra van szüksége.⁷²

Cianobaktériumok esetében a PG fontossága hasonló mértékű. Szerepének tanulmányozása PG szintézisére képtelen mutánsokon történt. Mind a *cdsA*, mint a *pgsA* gént azonosították, mint a PG bioszintézisében kulcsfontosságú enzimeket kódoló géneket.

Esetükben a mutánsok a tápoldathoz hozzáadott lipiddel életben tarthatóak voltak annak ellenére, hogy mindkét gén esszenciális mind *Synechocystis* sp. PCC6803, mind pedig *Synechococcus* sp. PCC7942 sejtekben.^{73,74} A PG szintézisére képtelen cianobaktériumok vizsgálata rámutatott, hogy a PG a fotoszintetikus apparátus strukturális szereveződésén kívül a fotoszintetikus elektrontranszport hibátlan működéséhez is elengedhetetlen membránkomponens, azaz funkcionális szerepet is vállal a PSII és PSI belső elektrontranszportjában. *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ és $\Delta cdsA$ mutánsok esetében a kívülről adagolt PG megvonása a tápoldatból PG kiürüléshez vezet.^{73,74} A PG kiürülés kinetikája erősen függ a kultúrák növekedési sebességétől, de korai fázisban egyértelműen összefüggésbe hozható a sejtek klorofill tartalmának csökkenésével, valamint a PSII oxigénfejlesztő aktivitás csökkenésével. A PG kiürülésének ebben a fázisában a PSI aktivitása nem változik.^{73,74}

A PSII oxigénfejlesztő aktivitásának gyors csökkenése összefüggésbe hozható a PSII belső elektrontranszportjának gátlásával, amelyet a thermolumineszcencia adatok alapján a másodlagos kinon elektronakceptor, Q_B redukciójának gátlódása okozhat *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ mutánsban.⁷⁵ Hasonló eredményre vezettek a klorofill-a fluoreszcencia indukció mérésén alapuló kísérletek, melyek során a PG éhező sejtekben a megemelkedett a F_0 értékét a PSII dimerek monomerizálódása, vagy a $Q_A^- Q_B$ elektronátmenet gátlódása okozhatja *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta cdsA$ mutáns esetében.⁷⁶ Ezek az eredmények a PG hatóhelyét a PSII komplexen belül a D1 alegység Q_B kötőhelye közelében lokalizálták *Synechocystis* sp. PCC60803 cianobaktériumban.

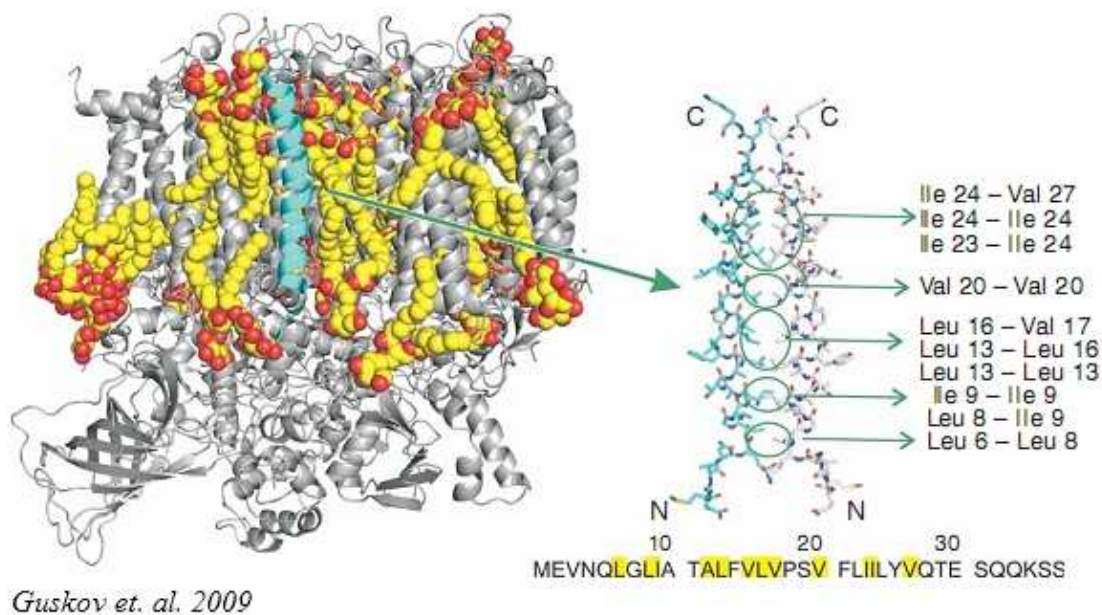
A PSI esetében a PG szerepe nem ennyire egyértelmű. Cianobaktériumokban a növényekkel ellentétben a PSI reakciócentrum általában trimer, vagy monomer formában található meg a tilakoid membránban. A trimerek és monomerek aránya szabályozás alatt áll, de a PSI trimer formáció pontos szerepe ismeretlen.⁷⁷ A PG megvonás hatására a PSI trimerek aránya lecsökken, azaz a PSI monomerizálódik. Ez a hatás a PSII reakciócentrumon észlelt hatásoknál később jelentkezik *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ mutánsok esetében, 14-18 nap PG éhezést követően.⁷⁷

1. 4. A lipidek szerepe a PSII szerkezeti integritásában és funkcionális működésében

Az oxigéntermelő fotoszintézis számos membránintegrált fehérjekomplex jelenlétét igényli a növények kloroplasztiszában, és a cianobaktériumok tilakoidmembránjában. Ezek közül a PSII hibátlan működése különösen nagy jelentőségű, hiszen a vízmolekulák oxidációjából elektronok, protonok és molekuláris oxigén fejlesztését végzi.⁷⁸ Szerkezeti felépítéséről röntgenkrisztallográfiai eljárásokkal gyűjtenek adatokat, leggyakrabban könnyen kristályosítható, hipertermofil cianobaktériumok PSII izolátumait felhasználva (*Thermosynechococcus elongatus*, *Thermosynechococcus vulcanus*).^{79,80,81} A PSII bonyolult felépítésű membránkomplex, melynek membránba ágyazott fehérjealegységei a CP43, CP47 klorofill tartalmú, fénybegyűjtő (antenna) fehérjék, a központi D1/D2 alegységek, 13 kisméretű alegység (citokróm b₅₅₉, PsbE, PsbF). Ezeken az alegységeken kívül még három alegység (PsbV, PsbO, PsbU) kapcsolódik hozzá a tilakoid lumen felőli oldalán, melyek nem membránba ágyazott fehérjealegységek. A CP43 és CP47 alegységekhez kötött klorofill-a molekulák csatornázzák a fényenergiát a reakciócentrumban található P680-ra ezáltal oxidálva azt. A P680-ról leváló elektron továbbhalad a fotoszintetikus elektrontranszport lánc további állomásain. A PSII-ben kétféle plasztokinon-9 (PQ) molekulatípust különítenek el, az egyik a Q_A kötőhelyen, rögzített pozícióban található és egyszerre egy elektron továbbítására képes a P680 és a Q_B kötőhelyen található másik fajta plasztokinon molekula felé. Utóbbi a Q_B kötőhelyre bekötődve két elektron és két proton felvételét követően, plasztokinolként (PQH₂) távozik a tilakoid membránban oldott plasztokinon készletbe. Minkét plasztokinon molekula a tilakoidba ágyazott PSII citoplazmához közelebbi felén helyezkedik el. A mobilis kinon összeköttetést teremt a PSII és a citokróm b_{6f} között. A citokróm komplexhez kötődve a redukált plasztokinol újraoxidálódik és visszatér a PSII-höz. A plasztokinolból származó elektronok továbbítódnak a PSI felé, a protonok pedig a tilakoid üregébe kerülnek.

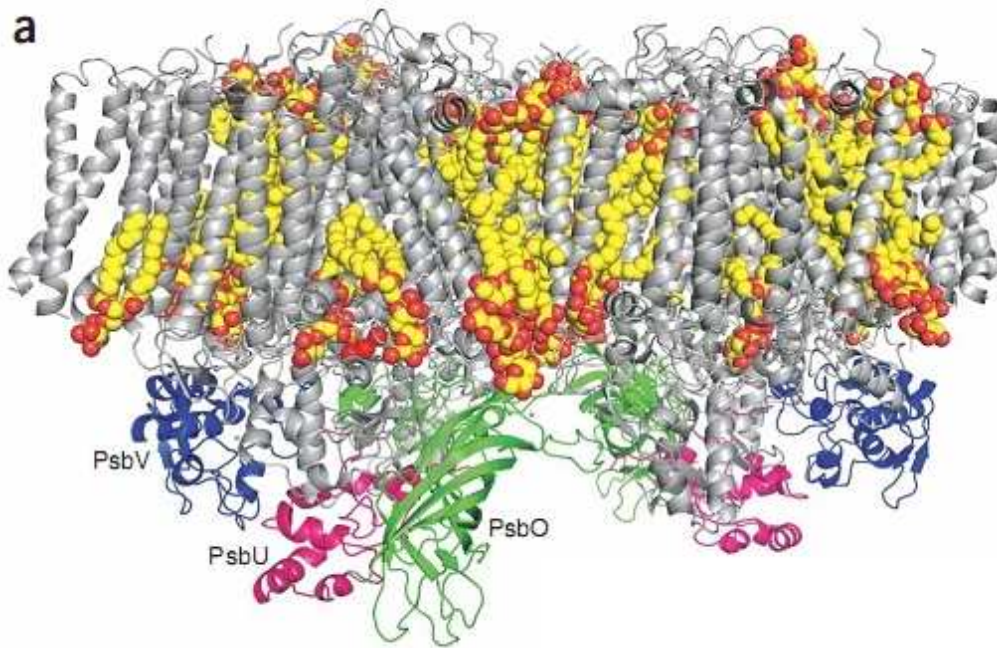
Thermosynechococcus elongatus izolált PSII komplexéből származó kristályok röntgendiffrakciós adataiból arra lehet következtetni, hogy a PSII komplexek homodimer formában találhatóak meg a tilakoid membránban. Közöttük fehérje-fehérje kölcsönhatást csak a két monomer PsbM alegységei között sikerült kimutatni. A PSII *in vivo* megjelenési formáját tekintve egyre több adat utal arra, hogy a PSII komplexek izolálása során

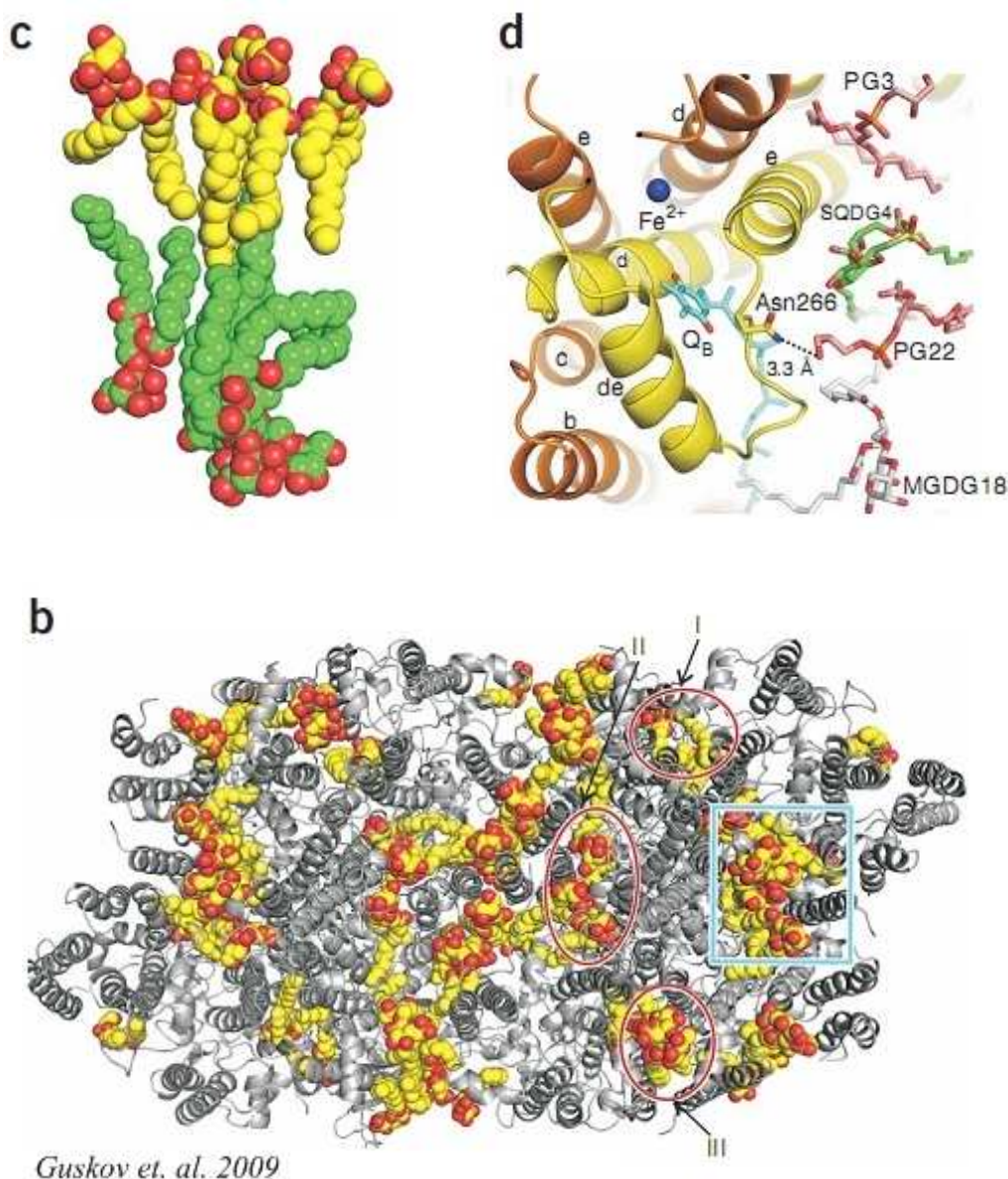
alkalmazott detergenssek elősegítik a dimerizáció folyamatát, ezáltal azt a képet sugallva, hogy a PSII természetes előfordulási formája dimerizált forma.^{82,83} Valószínűsíthetően a dimerizációt valóban elősegítik a tisztítás során felhasznált detergenssek, de a PSII in vivo előfordulási formája a lazán kötött dimer formáció lehet, melyre fluoreszcencia adatok is utalnak.⁸⁴ Mivel a két PSII monomer között a közvetlen fehérje-fehérje kölcsönhatások ritkák (PsbM-PsbM*), ezért PSII további összetevői (karotinoid molekulák) és a tilakoid membrán lipidjei jelentős szerepet játszanak a PSII dimerizációjában. Erre utal a PSII viszonylag magas lipid tartalma (25 lipidmolekula monomerenként) és a két monomer közötti térben található 14 lipid molekula (7-7 mindkét PSII monomerből), valamint a 8db β -DM (β -dodecil-maltozid) detergensmolekula, melyek valószínűsíthetően lipidek helyét foglalták el a kristályosítás során (9. ábra).⁸⁶



9. Ábra: A PSII monomer-monomer felszínének oldalnézeti képe. Felül a citoplazmás, alul a tilakoid lumen található. A fehérjék szürke, az egymással közvetlen kapcsolatba lépő PsbM transzmembrán helix világoskék színben látható. A monomerek közötti teret kitöltő lipid és detergens molekulák térkitöltő formában láthatóak (szén:sárga, oxigén:piros). Jobbra a két kapcsolatba lépő PsbM és PsbM* (*, a másik monomerből származó) fehérjék egymással kötésbe lépő aminosav oldalláncai láthatóak (C, N terminálisok jelölve). A közvetlen kapcsolatot létesítő aminosavak oldalláncai körökkel, betűjelei sárgával jelöltek.

A maradék 18 lipidmolekula nem a monomer-monomer kapcsolódási felület közelében helyezkedik el. Három a külső PSII régiókban található, hét lipidmolekula övet formálva veszi körbe a D1 és D2 alegységeket oly módon, hogy a DGDG1, DGDG2 a D1/CP43 között (**10b. ábra**, I-es ellipszis), az MGDG9-10-11 együtt az SQDG16-al és DGDG8-al a D2/CP47 között helyezkedik el (**10b. ábra**, II-III-as ellipszis).⁸⁶ A további 8 azonosított lipid (PG3, PG22, SQDG4, MGDG18 a citoplazmához közeli oldalon az MGDG7-19, DGDG5-6 a lumen felőli oldalon) egy kettősrétegű szigetet képez (**10b. ábra**, kék négyzet és **10c. ábra**). Ezt a lipid szigetet veszik körbe a D1, CP43, PsbE, PsbF, PsbJ és PsbK alegységek megformálva ezzel a PQ-PQH₂ kicserélődéséhez szükséges üreget (**10d. ábra**).⁸⁶





10. Ábra: Lipidek a PSII-ben. **(a)** A PSII oldalnézeti képe a membrán síkjának nézőpontjában felül a citoplazma alul a tilakoid lumen. A monomerenként megtalálható 25 lipidmolekula és 7 detergens molekula térkitöltő módon látható (szénatomok:sárga, oxigénatomok:piros). A membránba ágyazott fehérjealegységek szürke, a membránasszociált alegységek kék (PsbV), lila (PsbU), zöld (PsbO) színnel láthatóak. **(b)** A PSII homodimerben található lipidek elhelyezkedése a membrán síkjára merőleges nézőpontból ahol a fehérjék szürke a lipidek sárga (szén), piros (oxigén) színnel láthatóak. A 3 piros ellipszis lipidszigeteket jelöl (I, II, III) a kék négyzet a **(c)** ábrán látható kinagyítva. **(c)** A **b** ábrán látható kék négyzettel jelölt kettősrétegű membránformáció oldalnézeti képe, amely a PQ-PQH₂ kicserélődési zsebet tölti ki. A töltött PG3, PG22 és

SQDG4, valamint a neutrális MGDG18 a citoplazma felőli oldalon látható (felül, szénatomok:sárga, oxigénatomok:piros). A neutrális MGDG19, DGDG5-6, MGDG7 a lumen felőli oldalon helyezkedik el (alul, szénatomok:zöld, oxigénatomok:piros). **(d)** a Q_B (világoskék) közelében található lipidek. A képen a töltött PG3, PG22 (bíbor) és SQDG (zöld), a neurális MGDG18 (szürke) a nem-heme eredetű Fe²⁺ (kék gömb), valamint a D1 (sárga, QB kötő régió) és D2 (narancs) alegységek részletei láthatóak. A D1 konzervált aszparaginsav oldallánca (D1-Asn266) hidrogénkötést létesít a PG22 glicerinvázával.

Annak ellenére, hogy irodalmi adatok alapján a PG fontos szerepet játszik a PSII dimerizációjában, a PSI komplex trimeziációjában valamint az eukarióta LHCII oligomerizációjában a *Thermosynechococcus elongatus* PSII monomer-monomer kapcsolódási felület közelében nem azonosítottak PG molekulákat.^{85,86,87} SQDG molekulák azonban találhatóak az említett pozícióban arra utalva, hogy az SQDG-nek szerepe lehet a PSII dimerizáció elősegítésében, legalábbis *Thermosynechococcus elongatus* cianobaktériumban. A PG szerepet játszhat a D1 és a CP43 alegység egymáshoz kapcsolódásában, erre utalnak a *Synechocystis* sp. PCC6803 vizsgálatából származó eredmények.⁸⁴ A királyszerkezeti adatok alapján a két alegység között helyezkednek el a PG3 és PG22 lipidmolekulák, melyek valószínűleg a magas fényintenzitáson tapasztalható fotoinhibíció során más lipidekkel együtt könnyítik meg a sérült D1 fehérje javítása során a CP43 alegység mozgatását.⁸⁸

Synechocystis sp. PCC6803 mutánsok vizsgálata rámutatott, hogy a PQ-PQH₂ kicserélődési pont környékén található PG molekula szerepet játszik a PSII belső elektrontranszportjának szabályozásában. A korábbi PG3 és a legújabb krisályszerkezeti modell alapján azonosított PG22 molekula valóban közel helyezkedik el a PSII Q_B kinonkötő régiójához. A két lipidmolekula a D2 fehérjealegység egy részével és az MGDG18 és SQDG4 molekulával dugószerűen határolja a kinonkötő hely környékét, ezáltal segítve a plasztokinon molekulák közlekedését egyfajta hidrofób kapcsolaton keresztül (**10d. ábra**).⁸⁹

A PSII végső elektronakceptoraként a Q_B helyre kötődő plasztokinon molekula redukált formájának (PQH₂) kicserélődése friss plasztokinon molekulára esszenciális a PSII normális enzimatisz működése szempontjából. A legújabb kristályszerkezeti modell alapján egy harmadik kinonkötő hely is található a PSII komplexen (Q_C). A kristályszerkezeti modell plasztokinon molekuláinak a belépő és kijárat csatornához

viszonyított térbeli helyzete a PQ-PQH₂ kicserélődés három különböző modelljét feltételezi. A „váltakozó”, „kígyózó” és „egycsatornás” modellek közül a dolgozat a legutóbbi modellt használja fel.⁸⁹

2. Célkitűzések

A növények és cianobaktériumok tilakoid membránjának lipidösszetétele jelentősen hat a fotoszintézis fényreakcióira. A cianobaktériumok lipidösszetétele hasonló a magasabbrendű fotoszintetizáló organizmusok kloroplasztiszának lipidösszetételéhez.³⁵ Ez a konzervált lipidösszetétel és a fotoszintézis szempontjából kulcsfontosságú gének konzerváltsága teszi a cianobaktériumokat kiváló modellszervezetekké a fotoszintézis tanulmányozása szempontjából. Ugyanakkor egyes cianobaktériumok lipidosztályok szempontjából valóban hasonlítanak ugyan a növényi kloroplasztiszokra, de a lipidek zsírsavdalláncainak telítetlenségi foka jelentős különbségeket mutat.⁴² A *Synechocystis* sp. PCC6803 és a *Synechococcus* sp. PCC7942 közötti egyik legjelentősebb különbség, hogy az utóbbi lipidjeiben csupán egyszeresen telítetlen zsírsavak találhatók, míg az előbbi esetében a zsírsavösszetétel sokkal jobban hasonlít a növényi kloroplasztiszok zsírsavösszetételére (2-3 szorosán telítetlen zsírsavak).⁴²

Cianobakteriális modellszervezetekben a töltéssel rendelkező lipidkomponensek szerepének vizsgálata széles körben kutatott. Az SQDG és PG fiziológiai szerepének tanulmányozásához *Synechocystis* sp. PCC6803 cianobaktérium szolgált kísérleti objektumként.^{73,74} Ebben a törzsből azonban hasonlóan a növényi modellorganizmusokhoz az SQDG esszenciális szerepet tölt be, valamint zsírsavösszetétele is jelentősen különbözik a *Synechococcus* sp. PCC7942 cianobaktériumétól.^{42,67} A zsírsavösszetétel lényeges különbségén kívül *Synechococcus* sp. PCC7942 cianobaktériumban az SQDG nem esszenciális lipid. Az *sqdB* gén kiütését követően csak foszfát limitáló körülmények között mértek változásokat a vad típushoz képest⁹⁰. Az PG esetleges fajspecifikus fiziológiai szerepének tanulmányozása szempontjából a dolgozat a következő célokat jelöli meg:

1: Egy obligát fotoautotróf *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* sejtvonal létrehozása, mely modellrendszer jelentősen különbözik a korábbi *Synechocystis* sp. PCC6803 modelltől zsírsavösszetétel tekintetében.

2. A PG kivonás hatásának vizsgálata a lipid tartalomra és a zsírsav tartalom átalakítására

3: A PG kiürülés fiziológiás hatásának összehasonlítása a *Synechocystis* sp. PCC6803 $\Delta pgsA$, PAL/ $\Delta cdsA$ és *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ sejtekben. A PG törzsspecifikus szerepének meghatározása a fotoszintetikus komplexek oligomerizációs folyamataiban a *Synechocystis* sp. PCC6803 $\Delta pgsA$ és PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns tükrében.

4: A PG auxotróf, obligát fotoautotróf mutánsban a PG jelenlétében és hiányában mérhető alapvető fotoszintetikus folyamatok aktivitásának (oxigéntermelés) összehasonlítása.

3. Kísérleti anyagok és módszerek

3.1. Növekedési feltételek.

A *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ sejteket szilárd, BG11 agar lemezeken neveltem 500 μM nátrium acetát jelenlétében. Ezeket a lemezeket megfelelő antibiotikumokkal kiegészítve készültek a mutánsok. A vad típusú és mutáns sejtek a fiziológiai karakterizálás során BG11 folyadék tápközegben növekedtek, puffer hozzáadása nélkül, 500 μM nátrium acetát jelenlétében (ahol szükség volt rá a megfelelő antibiotikumokkal kiegészítve). A fotoautotróf növekedési feltételek megteremtéséhez a 150 ml-es lombikokban 50 ml mennyiségű kultúrák megvilágítására 30-35 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fénysűrűséget alkalmaztam. A kultúrák rázatásához 100 rpm sebességgel pörgetett, vízszintes rázót használtam normál széndioxid mennyiség jelenlétében.

A *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutáns kultúrákat 20 μM dioleoil-PG (18:1/18:1 PG, P-9664, Sigma, St. Louis), 50 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin, vagy 8 $\mu\text{g/ml}$ kloramfenikol jelenlétében tartottam fent. A PG kiürítését a sejtek centrifugálásával, PG mentes tápoldattal történő mosással, majd PG nélküli tápoldatba helyezéssel végeztem.

A *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ mutáns sejt vonal fotoautotróf módon, 20 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin, valamint 5 mM HEPES puffer (pH 7.5) jelenlétében növekedett. A további nevelési körülmények megegyeztek a *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutáns növekedési feltételeivel.

3. 2. A mutánsok létrehozása, transzformáció.

A *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutáns létrehozását általánosan használt molekuláris biológiai módszerekkel végeztem. *Escherichia coli* DH5a és XL1-Blue sejtek a megfelelő módszerek szerint szolgálták a transzformáló konstrukciók létrehozásakor (LB gazdag tápoldatban, 37°C-on nevelve).⁹¹ A *cdsA* lókuszt PCR amplifikációjához RCU1: 5'-CTCGAGCAACGCTTGCTTAT-3' és RCD1: 5'-AATTCGCATTGCCGCTGAGG-3' primerpárt használtam. A primereket a *Synechococcus* sp. PCC7942 cianobaktérium

elérhető, nyers genomszekvenciája alapján terveztem meg (http://genome.ornl.gov/microbial/syn_PCC7942/). A *Synechocystis* sp. PCC6803 genomja alapján (<http://genome.kazusa.or.jp/cyanobase/>) a *cdsA* gén kódoló szekvenciájának azonosítása homológiakereséssel történt. A primerek segítségével amplifikált 1596 bp hosszúságú genomi DNS szakasz a pMPM-A2⁹² befogadóvektorba klónoztam. A szekvencia helyességét automata szekvenátorral ellenőriztem. A klónozott fragment *MunI/HincII* szakaszát a pZE31, vagy pZE21 vektorok kloramfenikol/kanamycin rezisztenciát kódoló génjeivel helyettesítettem.⁹³ A *Synechococcus* sp. PCC7942 sejtek transzformálásához (a *cdsA* gén elrontása) inszerciós mutagenézist használtam a kanamycin rezisztenciát hordozó pRC5K1, vagy a kloramfenikol rezisztenciát hordozó pRC5C1 plazmidok felhasználásával optimalizált körülmények között.⁹⁴ A vad típusú sejteket korai logaritmus fázisig neveltem (OD₇₅₀: 0.6-0.8), majd bekoncentráltam. 2-3 ml kultúrát, centrifugálást követően 200-300 µl friss BG11-ben szuszpendáltam és 1-2 µg tisztított DNS hozzáadásával transzformáltam. A DNS jelenlétében 6 órán keresztül, optimális növekedési feltételek között inkubáltam (óránként felrázva), majd szelekció nélküli BG11 agar lemezre szélesztettem. 24 óra elteltével az agarlemez szélét felemelve, gátló koncentrációjú antibiotikumot juttattam sejtekhez. Az antibiotikum diffúzó segítségével jut el az agarlemezen növekedő sejtekig. 10-15 nap elteltével láthatóak az antibiotikum rezisztens transzformáns sejtek által képzett kóloniák, melyek ezt követően 2-3 hét szegregációs folyamaton mennek keresztül. Az elkészített mutáció szegregációs állapotának felméréséhez (a merodiploid, „heterozigóta” állapot követése) a *cdsA* lókuszt PCR amplifikációját használtam.

3. 3. Lipid analízis

A lipidek extrakciójához egész sejteket tartalmazó kultúrákat használtam. A lipidextrakciót a Blight-Dyer módszerrel végeztem 10 mg fehérjét tartalmazó mintákat felhasználva.⁹⁵ A lipidosztályok elválasztására vékonyréteg kromatográfia adott lehetőséget (szilikagél vékonyréteg lapok, Merck 5721). A futtató elegy összetétele 65:35:5 arányú kloroform:metanol:ammónium-hidroxid (28%) miatt a lipidek szétválasztását követően a lipidosztályok sorrendje a szilikagél lapokon (fentről lefelé) MGDG-DGDG-SQDG-PG. A

kvalitatív analízis során belső kontrollt (15:0) alkalmaztam. A lipidosztályokat a vékonyrétegen ANSA (8-anilino-1-naftalén-szulfonsav) metanolos oldatának a lemezre permetezésével, UV megvilágítással tettem láthatóvá. A lemezen bejelölve, majd 50 µg 15:0 zsírsav belső kontroll felvitelét követően a vékonyréteg lemezéről lekapartam az elválasztott MGDG, DGDG, SQDG, PG sávokban található lipideket.⁹⁶ Az izolált lipideket 5% sósavat tartalmazó metanolban észteresítettem, majd ezt követően a keletkező zsírsav metilésztereket hexánba átrázva Hewlett Packard HP689 gázkromatográffal Supelco SP2330 kapilláris oszlopon mértem le. Az egyes lipidosztályok össz mennyiségét a hozzáadott belső kontroll mennyiségére normáltam, majd a relatív molszázalékok kiszámítását követően a PG jelenlétében és PG hozzáadása nélkül nevelt mintákból származó adatokat összehasonlítottam.

3. 4. A sejtsűrűség, fehérjekoncentráció és pigment tartalom vizsgálata spektroszkópiai módszerekkel

Meghatározott mennyiségű sejt fényelvezését (750 nm hullámhosszú fényt alkalmazva), megfelelő hígításban Shimadzu UV-3000 spektrofotométerrel (Columbia, MD) mértem meg. A fényelvezés meghatározását követően a sejteket lecentrifugálva, 7:2 arányú acetón:metanol keverékkel extraháltam, ezáltal kivonható a klorofill-a tartalom.⁹⁷ A feloldott klorofill koncentrációját annak abszorpciós maximumán mérve (7:2 acetón:metanol oldószerben 663 nm), 82 mM⁻¹ cm⁻¹ extinkciós állandót használva számoltam ki. A színanyagok kivonását követően az acetón:metanolban nem oldódó sejttörmelék fehérjekoncentráció meghatározásához használtam fel (Lowry módszer).⁹⁸ A kalibrációs egyenest BSA (borjú széróm albumin) hígítási sor mérésével határoztam meg. Minden leoltás során a PG jelenlétében nevelt és a PG nélkül indított kultúrák 50 µg/ml kezdő fehérjekoncentrációval rendelkeztek. A kultúrák növekedését fényelvezésük alapján követtem, valamint kiegészítő méréseként minden 24 óra nevelést követően a kultúrák fényelvezésén kívül fehérje és pigment tartalmát is meghatároztam egyetlen mintavétel során. Minden mérési pont 3 független nevelésű kultúra adataiból tevődik össze. Minden

kultúra esetében 2 mintavétel kiértékelése történt meg 24 óránként. A PG jelenlétében és PG hiányában nevelt kultúrák egyazon indítókultúrából származtak.

A kultúrák abszorpciós spektrumát Shimadzu UV-1601 spektrofotométerrel és 3ml-es kvarcküveták alkalmazásával vettem fel. A spektrumok alapvonalát két üres tápfolyadékkal (BG11) feltöltött küvetával korrigáltam oly módon, hogy a küveták homályos oldalukkal estek a fényútba. A spektrumokat minden említett időpontban 3-3 független, fehérjekoncentrációra normalizált minta lemérése szolgáltatva (200 µg/ml), melyeket normál mérési sebesség mellett mértem. A felvett spektrumokat tovább normáltam a sejtek fikobiliprotein tartalmának elnyelési maximumához (625 nm).⁹⁹

3. 5. A fotoszintetikus oxigénfejlesztő aktivitás mérése

A kultúrák oxigénfejlesztő aktivitását intakt sejteken, Clark-típusú oxigénelektród alkalmazásával mértem meg (Instruments, Kings Lynn, U.K.).¹⁰⁰ A teljes elektrontranszportlánc aktivitása ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2$ végső akceptorig), valamint a PSII saját aktivitása hozzáadott, mesterséges elektronakceptor ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow 500 \text{ µM}$ p-benzokinon) alkalmazásával határoztam meg. A méréseket telítő fénysűrűség mellett (500 µM foton $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), vörös előszűrőssel, 5 µg/ml normalizált klorofilltartalom beállításával végeztem. A megfelelő mértékű oxigénfejlesztés méréséhez szükséges volt a sejtek mosása friss tápoldatban a mérést megelőzően. Az oxigén elektrodot minden méréssorozatot megelőzően glükóz-oxidázzal kalibráltam.

3. 6. Flash-indukált fluoreszcencia lecsengés mérése

A flash-indukált fluoreszcencia lecsengésének kinetikáját 150 µs és 100 s közötti időtartományban dupla modulációs PAM fluoriméter segítségével mértük (PS instruments, Brno).¹⁰¹ A 200 µg/ml fehérjetartalmú mintákat használtunk a méréshez. A görbék alakját, a fluoreszcencia lecsengés kinetikáját összehasonlítottuk a PG éheztetett és PG jelenlétében nevelt minták között. A minták F_{max} értékét 1-re normáltuk.

3. 7. Fehérje analízis

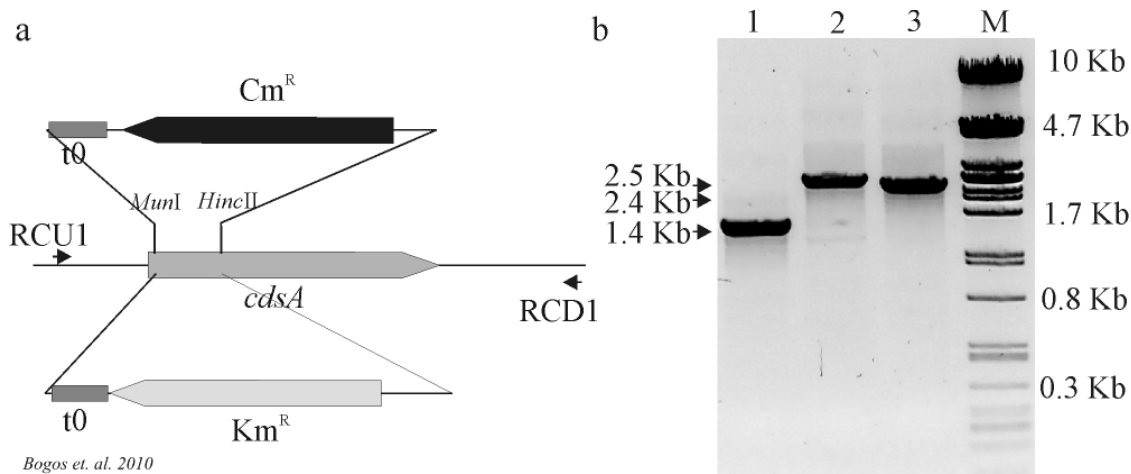
75µg összklorofillt tartalmazó sejtmennyiséget radioaktívan jelöltünk [³⁵S]Met (>1,000 Ci mmol⁻¹ Izótóp Intézet Kft, Magyarország) hozzáadásával 60 µmol foton m⁻² s⁻¹ fénysűrűség mellett, 29°C-on. 20 perc jelölést követően a fotoszintetikus membránokat a korábban ismertetett módszerek alapján izoláltuk.¹⁰² A cianobakteriális membránok kinyerése érdekében a sejteket 150-200 mikron átmérőjű üveggyöngyök alkalmazásával tártuk fel.¹⁰³

Az izolált membránok fehérje komplexeinek elválasztása dodecil-β-D- maltozid szolubilizációt követően, 4 °C -on inkubált, 5-14% akril-amidot tartalmazó natív gradiens történt (BN-PAGE).¹⁰⁴ A második dimenzió (SDS-PAGE) futtatásához a teljes natív gél sávját izoláltuk, Tris-HCl (pH 7.5) pufferben, 1% SDS jelenlétében 30 percig áztatva denaturáltuk, majd a gélcsíkot a denaturáló, második gél tetejére rétegeztük. A második futtatás 12-20% poliakrilamid gradienst alkalmazott 7M Urea jelenlétében. A gélfuttatást követően a fehérjefoltok kimutatása Coomassie festéssel történt, illetve a radioaktív jelölést követően a röntgenfilmet 2-3 napig exponáltuk, majd a filmet előhívtuk.

4. Eredmények

4. 1. A *Synechococcus* sp. PCC7942 *cdsA* génjének inaktiválása

A CDP-diacilglicerin szintéziséért felelős *cdsA* gén esszenciális génje a *Synechococcus* sp. PCC7942 cianobaktériumnak. Inaktiválásához mindenekelőtt azonosítani kellett a hozzáférhető nyers genomi adatok alapján. Homológia keresés alapján a *Synechocystis* sp. PCC6803 *cdsA* génjének szekvenciáját felhasználva sikerült azonosítani a feltételezett célgént. A *Synechocystis* sp. PCC6803 slr1963 kódnévvel ellátott *cdsA* génje 77%-os homológiát mutatott, valamint fehérjeszinten a kódolt aminosavak több mint fele (62%) azonos volt a *Synechococcus* sp. PCC7942 Synpcc7942_0394 kódnevű génjével. *Synechococcus*-ban a gén két hipotetikus ORF közé ékelődik, és azokkal ellentétes irányban íródik át. A kódolt fehérjeszekvencia tartalmazza a citidil-csoport transzferéhez szükséges konzervált domént, tehát a feltételezett enzimaktivitás is arra utalt, hogy a gén valóban CDP-diacil-glicerin szintéziséért felelős fehérjét kódolja *Synechococcus* sp. PCC7942 cianobaktériumban. A magas homológia, és a feltételezett enzimaktivitás azonosítását követően az RCU1/RCD1 PCR primerekkel klónoztam a *Synechococcus* sp. PCC7942 cianobaktérium kromoszómájának *cdsA* gént tartalmazó lókuszt, mely szakasz a 1232339-as bázispártól a 1233934-as bázispárig terjedő 1595 bp nagyságú kromoszómaszakaszt jelenti. Inszerciós mutagenézis technikáját felhasználva kloramfenikol (Cm), vagy kanamycin (Km) rezisztenciát kódoló gént sikerült a kromoszóma *cdsA* gént kódoló szakaszára juttatni oly módon, hogy a homológ rekombináció eredményeképpen a *cdsA* gén rövid *MunI/HincII* genomi szakasza az antibiotikum kazettára cserélődött (**11. ábra**).



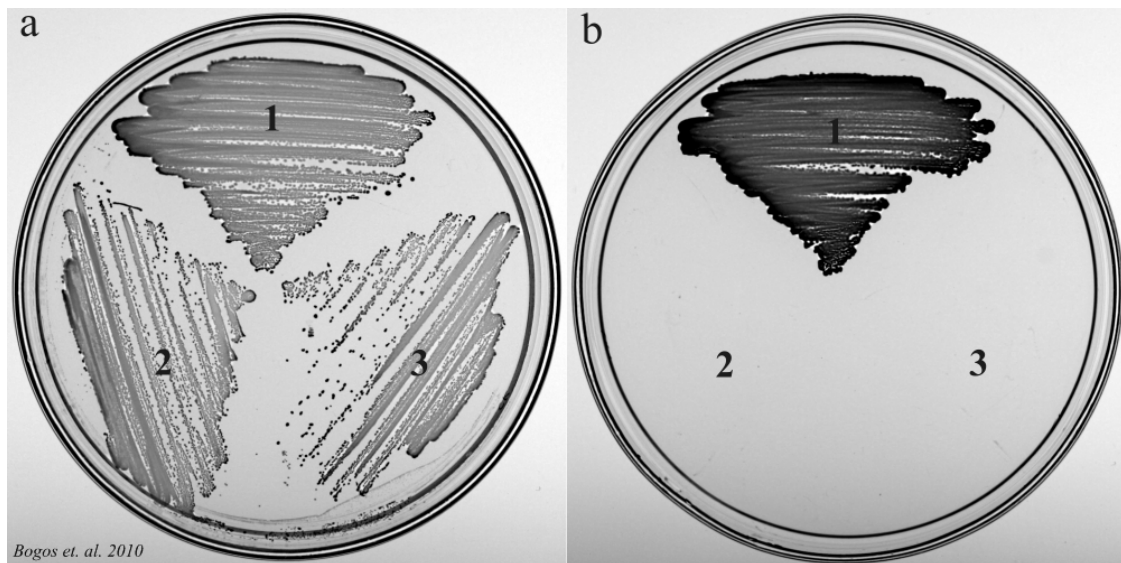
11. ábra: A kromoszómán található *cdsA* gén inaktivációja. (a) A *cdsA* gén kromoszómális részletének fizikai térképe. A $\Delta cdsA$ mutánsban a 209bp méretű *MunI/HincII* szakasz kicserélődik a transzformáló antibiotikum rezisztenciát kódoló génre. A Cm^R kloramfenikol, a Km^R kanamycin rezisztenciát kódol. Mindkét gén mögött erős transzkripció terminátorok találhatók (t0). A fekete nyilak a klónozáshoz, illetve a szegregáció ellenőrzéséhez használt primerpárt jelölik. (b) Az RCU1/RCD1 primerpárral végzett ellenőrző PCR-ek elektroforetikus képe. (1) Vad típusú kromoszómaregió. (2) Kanamycin rezisztens transzformáns kromoszómájáról felíró DNS szakasz, amely nagyobb a vad típusnál látható szakasznál a beékelődött antibiotikumkazetta miatt. (3) Kloramfenikol rezisztens transzformáns ellenőrzése. A felíró DNS szakaszok mérete ugyanazon gélen futtatott *PstI* restrikciós enzimmel hasított Λ -DNS alapján határozható meg (M).

Mivel a *Synechococcus* sp. PCC7942 sejtekben növekedési fázistól függően több kópiában (8-10) van jelen a kromoszómális DNS, ezért a transzformálás eredménye minden esetben egy olyan ún. merodiploid sejt vonal lesz, mely egyaránt tartalmazza a célgén elrontott kópiáját hordozó kromoszómát a vad típusú kromoszómákon kívül. Ebben az állapotban a $\Delta cdsA$ mutáns antibiotikum rezisztens fenotípust mutat, azaz képes növekedni a tápoldathoz adott megfelelő antibiotikumok jelenlétében, ellenben PG szintézisére is képes mindaddig, amíg a vad típusú kromoszómák el nem tűnnek egy hosszadalmas szegregációs folyamat során. A szegregáció során a PG auxotróf fenotípus elérése érdekében dioleoil-PG (18:1/18:1) hozzáadása szükséges. Ugyanezt a szintetikus PG származékot a *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ mutáns esetében is alkalmazták, miután bebizonyosodott, hogy ez a fajta zsírsavösszetétel megfelelő a sejtek életben tartásához és a normális fotoszintetikus működéshez.¹⁰⁵ A szelektáló antibiotikum koncentrációjának emelése révén kontraszelekció érvényesül a vad típusú kromoszómákkal

szemben. A szegregáció állapotát PCR reakciók segítségével követhetjük folyamatos BG11 agar lemezekre történő továbboltás mellett egyedi kolóniákból származó DNS-t ellenőrizve. A szegregációs folyamat átlagosan 1 hónapig tart attól függően, hogy mennyire erős a mutáció miatt kialakuló előnytelen fenotípus. Sok esetben csupán a merodiploid állapot rögzül, és az esszenciális gén kiütése sikertelen marad. A $\Delta cdsA$ mutánsok esetében a gén elvesztésével járó PG szintézisére képtelen fenotípus részben/teljesen komplementálható a tápoldatba adagolt PG hozzáadásával. Ennek megfelelően a „homozigóta” mutáns előállítható, azaz a *cdsA* gén kiüthető a törzsből. A gén kicserélésére használt antibiotikum rezisztencia minősége nem befolyásolja a kialakult fenotípust, azaz kloramfenikol, és kanamycin jelenlétében nevelt $\Delta cdsA$ mutánsok vizsgált fenotípusában nem mutatkoztak jelentős különbségek a kísérletek során. Annak érdekében, hogy a kromoszómára juttatott antibiotikum rezisztenciát kódoló gén saját promótere révén ne befolyásolja a környezete expressziós mintázatát (poláris hatás) minden esetben erős transzkripciós terminátorok találhatóak rezisztenciagének mögött (**11. ábra**).

4. 2. A PG kiürülés hatása a *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutáns sejtek növekedésére és pigmentösszetételére.

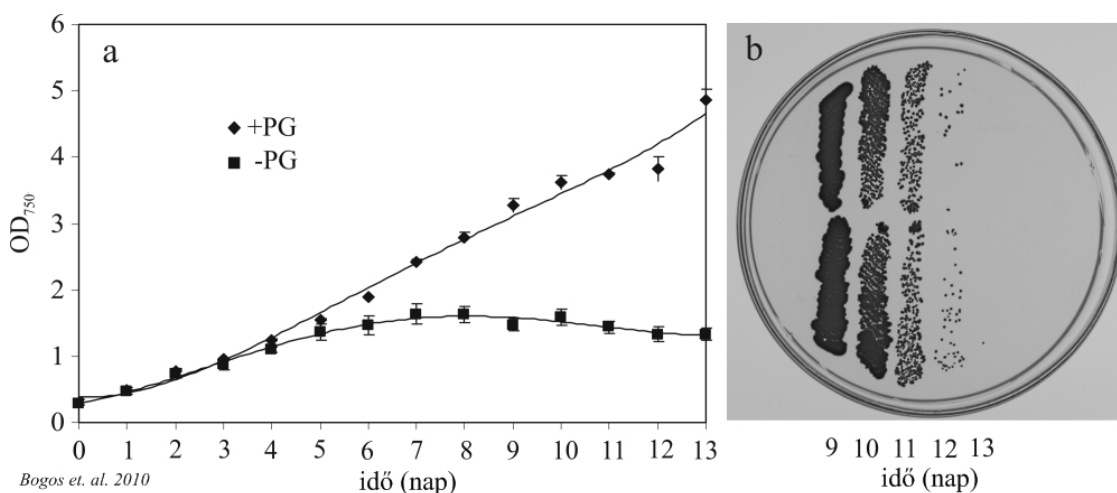
A $\Delta cdsA$ mutáns sejtek növekedéséhez mind folyadék tápoldatban, mind pedig BG11 agar lemezeken szükség volt kiegészítésként 20 μ M PG jelenlétére. A mutáns sejtek képesek voltak felvenni a környezetükben található lipidmolekulákat ezáltal a letális fenotípust sikerült komplementálni, valamint a mutáns növekedését tekintve nagyon hasonló tulajdonságokat mutatott a kiindulási vad típussal. A teljesen szegregált transzformánsok PG hozzáadása mellett képesek voltak növekedni BG11 agar lemezeken, ellenben PG hiányában letális fenotípust mutattak (**12. ábra**).



12. ábra: *Synechococcus* sp. PCC7942 vad típus (1), kloramfenikol rezisztens $\Delta cdsA$ mutáns (2) valamint kanamycin rezisztens $\Delta cdsA$ mutáns (3) növekedése BG11 agarlemezen PG hozzáadása nélkül (b) illetve PG kiegészítés mellett (a).

A PG növekedésre gyakorolt hatása folyadék kultúrák esetében is lemérhető. A *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutánsok növekedése fotoautotróf körülmények között, PG jelenlétében folyamatos, akár 13 napos nevelés után is növekedő tendenciát mutat (**13a. ábra**). A kultúra sejtszámának növekedéséről az optikai denzitás 750nm-en történő követése ad információt. PG jelenlétében előnevelt kultúrákat a korai növekedési fázisukban PG-mentes tápoldatba helyezve át jelentős változások láthatóak a mutáns növekedését tekintve. A mutáns növekedése 3 napos periódust követően lelassul, majd 5 nap elteltével az optikai denzitás alapján becsült sejtszám eléri a maximumát. Az 5 napos inkubációt követően a sejtek optikai denzitása a kezdeti 0.25-ről (750nm) 1.65-re nőtt, majd a következő 5-6 napos perióduson keresztül ezen az értéken stagnál. 11 napos PG megvonást követően az 1.65-ös OD lecsökken 1.35-re (**12a. ábra**). Az optikai denzitás önmagában a kultúrákban található fényszóró részecskék sűrűségétől függ, de nem tesz különbséget élő illetve halott sejtek között. Annak érdekében, hogy az élő sejtek hozzávetőleges aránya a PG éhező kultúrában követhető legyen kis mennyiségű inokulum (átoltó kacs által felvett folyadékmennyiség) PG tartalmú, BG11 agar lemezre oltása szükséges. Ugyanazon PG éhező kultúrából 9-13 napos időpontokban kioltott

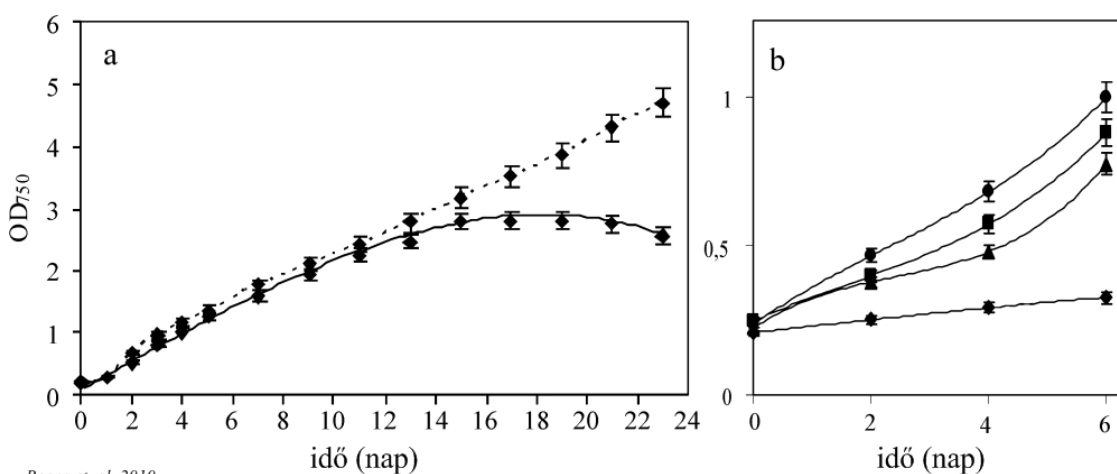
inokulumokban az életképes sejtek száma erős csökkenést mutat. Ez arra utalhat, hogy ilyen tartós PG megvonás a sejtek többségére letális hatással bír (**13b. ábra**). Az eredményekből az is következik, hogy a kultúrában található sejtek túlnyomó többsége nem éli túl a 13 napos, vagy annál tartósabb PG megvonást.



13. ábra: (a) A *Synechococcus* sp. PCC7942/Δ*cdsA* mutáns növekedési görbéje PG jelenlétében (♦) és annak megvonásakor (■). A görbék a kultúrák 750nm-en mért fényszórása alapján készültek. (b) Egy reprezentatív, PG éhező Δ*cdsA* mutáns kultúrában található élő sejtek mennyisége 9-13napos PG éhezés során.

A *Synechococcus* sp. PCC7942/Δ*cdsA* mutáns növekedési paraméterei hasonlítanak ugyan a korábban közölt *Synechocystis* sp. PCC6803/ Δ*pgsA* mutánsra, de ugyanakkor markáns különbségek is megfigyelhetők.⁷³ Mindkét mutáció a PG bioszintézisében okoz maradandó károsodást, azonban a *pgsA* gén kódolta foszfatidilglicerín-foszfát-szintáz egy későbbi enzimatikus lépést katalizál, mint a *cdsA* gén kódolta CDP-diacilglicerín-szintáz (**7. ábra**). Mindkét mutáns képtelen PG hiányában fotoautotróf módon növekedni. A törzsek közötti lényeges különbségekről a dolgozat korábbi fejezeteiben esett már szó. A *Synechocystis* sp. PCC6803/Δ*cdsA* mutánsról ugyan rendelkezésre állnak adatok, de a közölt/eltérő nevelési feltételekből adódóan ezek nem hasonlíthatók össze a *Synechococcus* sp. PCC7942 mutáns jellemzőivel.⁷⁴ A *Synechocystis* sp. PCC6803/Δ*pgsA* mutánsnak ugyanazon nevelési körülmények között PG jelenlétére van szüksége. PG jelenlétében és hiányában is azonban kissé eltérő növekedési görbék mérhetőek ennél a mutánsnál (**14a. ábra**). A *Synechocystis* mutáns PG jelenlétében 21 napos nevelési

periódus alatt folyamatos növekedést mutat, viszont ez a növekedés lassabb ütemű, mint a *Synechococcus* $\Delta cdsA$ mutáns növekedése. PG éhező kultúrák esetében a *Synechocystis* mutáns nagyobb optikai denzitást ér el, növekedése csupán 11 nap PG megvonást követően lassul le, majd 15 napos éhezést követően teljesen leáll. A különböző éhezési stádiumban levő *Synechocystis* sejtek PG tartalmú tápoldatba áthelyezve még 19 nap éhezést követően is képesek újra növekedni (az élő sejtek aránya ezesetben ismeretlen) (14b. ábra). A különböző növekedési görbék PG tartalmú tápoldatban valószínűleg a leoltások eltérő elősejtszámból következnek, vagy a sejtek eltérő alkalmazkodó-képességéből egyre súlyosabb PG éhezés miatt. A *Synechocystis* $\Delta pgsA$ mutáns esetében az elősejtszám becslése sikertelen volt PG tartalmú BG11 agar lemezen.



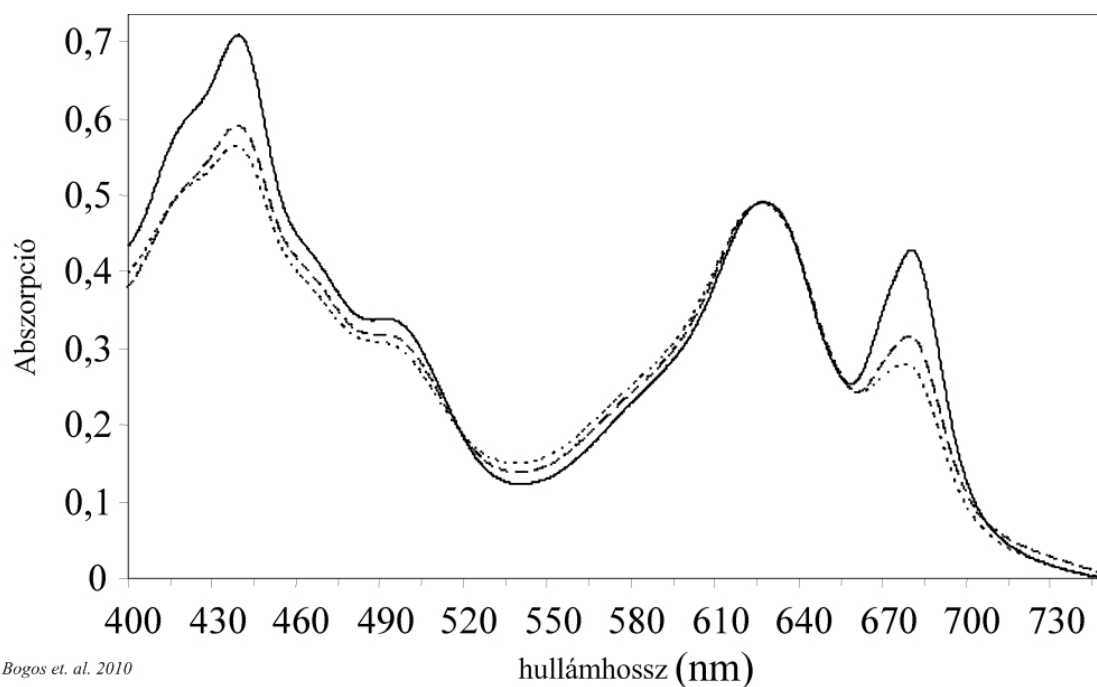
Bogos et. al. 2010

14. ábra: (a) A *Synechocystis* sp. PCC6803/ΔpgsA kultúrák növekedési görbéje PG jelenlétében (...) és hiányában (—). (b) Újra leoltott PG éhező kultúrák növekedési görbéje 17 (●), 19 (■), 21 (▲) és 23 (◆) PG éhezést követően.

Amíg a *Synechocystis* sp. PCC6803 sejtek 21 napos PG megvonás után is képesek voltak növekedni PG tartalmú tápfolyadékban, addig a *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns kultúrákban a sejtek többsége nem éli túl a 13 napos PG éhezést, valamint eleve alacsonyabb optikai denzitás elérésére képes PG hiányában. Láthatóan a *Synechocystis* mutánsok kevésbé érzékenyek a PG megvonás negatív következményeire, ugyanakkor nem hagyható figyelmen kívül az eltérő növekedési sebesség, a törzsek különbsége, és a mutációk különbözősége a két törzs összehasonlításakor.

4. 3. A PG kiürülés hatása a *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns sejtek klorofill és fehérjetartalmára.

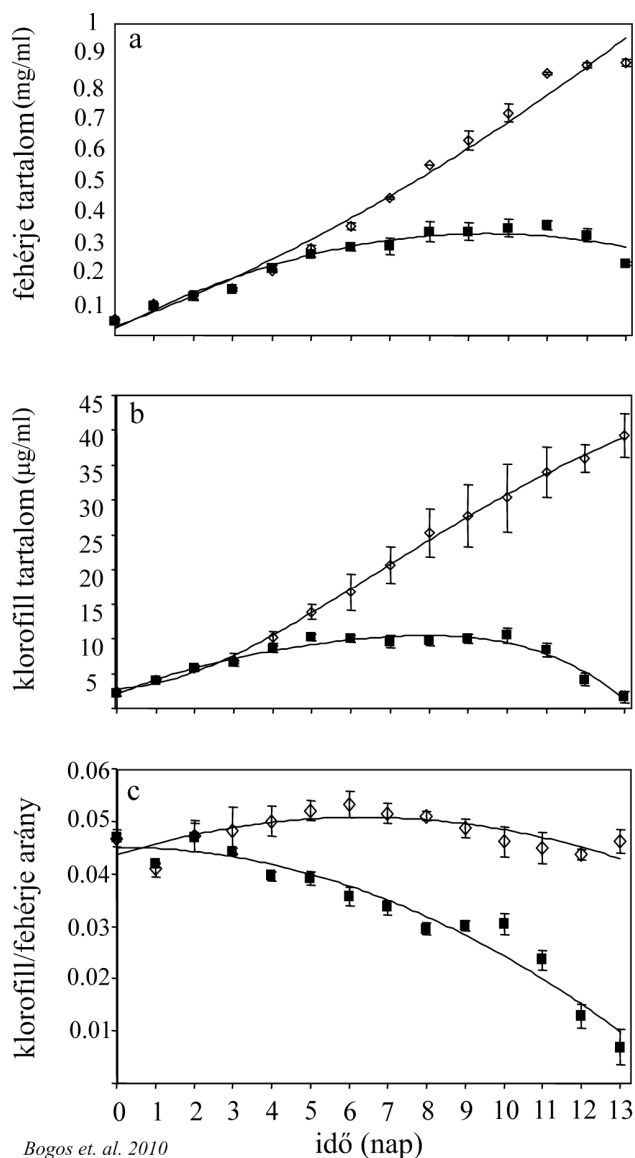
A pigment tartalom hozzávetőleges becslésére kiváló módszer a kultúrák abszorpciós spektrumának felvétele. A *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* kultúrák abszorpciós spektruma jellegzetes változásokat mutat PG éhezés során. 6 napos PG éhezést követően a spektrumok 680nm-nél mért abszorpció értéke (klorofill-a) jelentősen csökkent a sejtek fikobiliprotein tartalmához képest (625nm) (**15. ábra**). A spektrumokat a sejtek fikobiliprotein tartalmának elnyelési maximumára normáltam. A normalizáció elvégezhető, mivel a kultúrák fehérje/fikobiliprotein aránya jelentősen nem változik éhezés során (azonos fehérjetartalomra beállított minták 625nm-en történő elnyelése).



Bogos et. al. 2010

15. ábra: *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ kultúrák abszorpciós spektruma 20 μ M PG jelenlétében (—), valamint 6 nap (---) és 10 nap (...) PG megvonást követően. A spektrumok 200 μ g/ml fehérjetartalomra beállított kultúrák adatait mutatják, melyeket tovább normáltam a 625nm-es csúcsra (fikobiliproteinek).

Részletesebb adatok nyerhetők a kultúrák teljes fehérjetartalmának, és klorofill-a tartalmának meghatározásával PG jelenlétében, illetve PG megvonás során. A kultúrák klorofilltartalma PG éhezés során a 3. napig folyamatos növekedést mutat, hasonlóan a PG jelenlétében nevelt mutáns kultúrákéhoz. A 3. napot követően a klorofilltartalom növekedése megtorpan, majd az 5. napot követően 10 μ g/ml koncentrációnál megáll. Ez a jellemző lassulás egybeesik a sejtek optikai denzitásából következő adatokkal. A klorofillszintézis gátlása egybeesik a mutáns kultúrák növekedésének megtorpanásával PG éhezés során (**13a. és 16b. ábra**). PG jelenlétében a kultúrák klorofilltartalma 13 napos nevelést követően elérheti akár az 50 μ g/ml koncentrációt is. Ezzel ellentétben PG megvonás során a klorofilltartalom 10 μ g/ml koncentrációnál stagnál az 5. és a 10. nap közötti időszakban. A 10. napot követően a kultúrák klorofilltartalma meredek zuhanásba kezd, majd a 13. nap PG éhezést követően az élő sejtekkel együtt a detektálhatósági szint alá csökken a kultúrákban (**13b. és 16b. ábra**).



Bogos et. al. 2010

16. ábra: *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* kultúrák (a) összfehérje tartalma, (b) klorofill tartalma illetve (c) a klorofill/protein aránya PG jelenlétében (◇) és PG éhezés során (■).

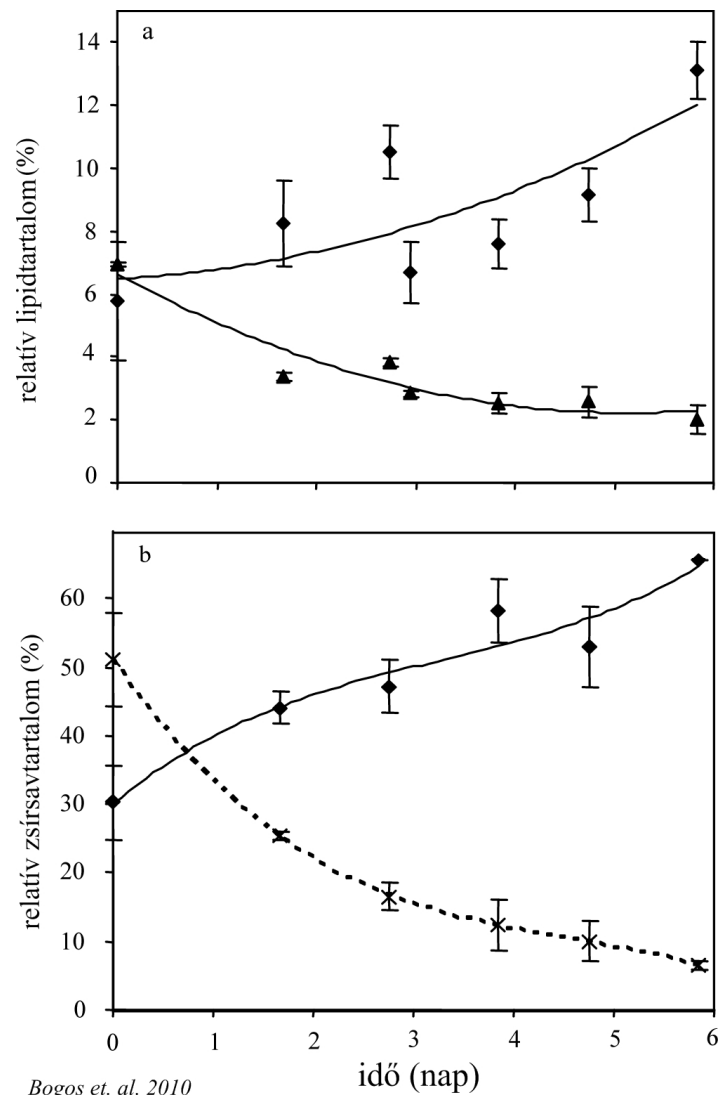
A kultúrák fehérjetartalma alapján meghatározható a fotoautotróf módon nevelt biomassza duplázódási ideje PG jelenlétében és PG hiányában. A módosított Lowry-teszt alapján mért fehérje adatok szerint mind PG jelenlétében, mind pedig hiányában a teljes fehérjetartalom 36-38 óra alatt duplázódik meg *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns sejtekben (**16a. ábra**). A biomassza ilyen sebességű növekedése egészen a 4. napig tartható PG nélkül nevelt kultúrákban (2-3 duplázódás). Ezt követően a 4. és a 9. nap között a

fehérjetartalom növekedése lelassul, majd a 9. napot követően a csökkenő tendenciát mutat. Ez a csökkenés összefügg a kultúrákban található élő sejtek számának csökkenésével a 9-13. nap közötti időszakban, és valószínűleg a halott sejtek fehérjetartalmának lassú degradációjából fakad (**13b. ábra**).

Az adatokból az is következik, hogy a kultúrák kivonható klorofilltartalma sokkal gyorsabban kezd el csökkeni 10 napos PG éhezést követően. A kultúrák karotintartalma azonos növekedési, telítési és csökkenési tulajdonságokat mutat, mint a mért klorofilltartalom. Feltételezhetően a sejtek többségének halála után a felszabaduló pigmentek sokkal gyorsabban degradálódnak, mint a fehérjetartalmuk. Az egységnyi fehérjére vonatkoztatott klorofilltartalom számítását követően ez a relatív csökkenés még szembetűnőbb (**16c. ábra**).

4. 4. A PG megvonás hatása a *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* lipid és zsírsavösszetételére

A PG megvonásának drámai hatásai vannak a sejtek lipid és zsírsavösszetételére. A PG kezdeti mennyisége a *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns esetében 8% körül van, ami jóval alacsonyabb a vad típusú sejtek PG tartalmánál (14-19%).⁴⁰ Ez a PG tartalom nagyon gyorsan csökkenő tendenciát mutat PG hiányában és ez a csökkenés látványosan követi az osztódások számát is. A biomassa két duplázódási idején belül a sejtek PG tartalma a kezdeti 8% negyedére, azaz 2%-ra csökkent. Ez egyértelmű jele annak, hogy a Δ *cdsA* mutáns sejtek képtelenek a PG szintézisére, azaz a gén deléciója teljesen szegregált. További PG éhezést követően a sejtek PG tartalma 6 nap alatt 2% alá csökken (**17a. ábra**).



Bogos et. al. 2010

17. ábra: A PG kiürülés hatása a sejtek anionos glicerolipid tartalmára. **(a)** A mutáns sejtek PG tartalmának (▲), valamint SQDG tartalmának (◆) változása a PG éhezés első 6 napos periódusában. **(b)** A mutáns sejtekből izolált PG 18:1 (x) és 16:0 (◆) zsírsavkomponenseinek arányváltozása 6 nap PG éhezés során.

A PG kiürülésével egyidőben a sejtek SQDG tartalma 6%-ról több mint 12%-ra nő. Ez arra utal, hogy a membránok teljes negatív töltésének mennyisége állandó értékének közelében marad. *Synechococcus* sp. PCC7942 esetében korábban megállapították, hogy a megemelkedett SQDG tartalom képes részben átvenni a PG szerepét a membránokban. Erre utalhat az is, hogy a sejtek a megemelkedett SQDG tartalom mellett még közel 4-5 napig életképesek maradnak. Ugyanakkor fontos leszögezni, hogy az SQDG nem képes teljesen helyettesíteni a kieső PG miatt sérülő funkciókat, hiszen a mutáns elpusztul 13 nap

PG éhezést követően (**17a. és 13b ábra**). A *Synechocystis* sp. PCC6803/ Δ *pgsA* mutáns esetében nem észleltek hasonló SQDG mennyiség-növekedést.^{73,74}

A mutáns kultúrákból izolált PG zsírsavösszetételében domináns részben található 18:1 (olajsav). Ez a domináns olajsav mennyiség PG éhezést követően markáns csökkenésbe kezd és a kezdeti több mint 50%-ról 6 nap alatt 10% alá csökken az izolált PG frakcióban. Az olajsav gyors csökkenése mellett a 16:0 (palmitinsav) mennyisége a kezdeti 30%-ról a duplájára nő (**17b. ábra**). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a mutáns sejtek képesek felvenni a tápoldathoz adagolt dioleoil-PG-t, majd azt egy lassú folyamat részeként átalakítva a vad típusú zsírsavösszetétel kialakítására törekednek a PG esetében.⁴² Ezt a vad típusúhoz közeli zsírsavösszetételt pedig a PG molekulák aktív átalakításával érik el. A lipidmolekulák aktív átalakításának folyamatát eddig csak *Synechocystis* sp. PCC6803 cianobaktérium esetében írták le a fotoszintézisre képes organizmusok közül.¹⁰⁶

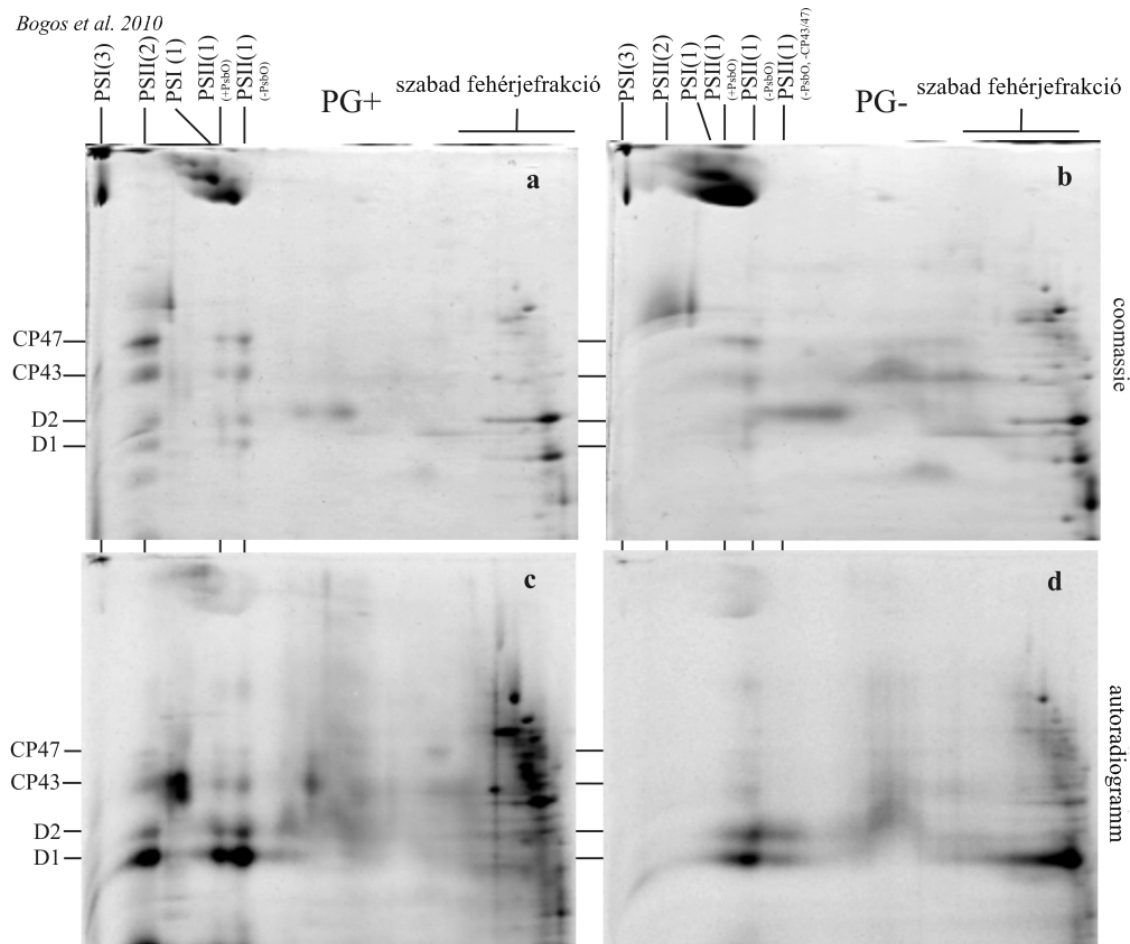
4. 5. A PG szerepe a PSII fehérje alegységek szintézisében, és összeszerelődésében

A tilakoidban található nagyméretű fehérjekomplexek tanulmányozására kiváló módszer a kétdimenziós gélelektroforézis. A megfelelő módon izolált tilakoid membránok fehérjekomplexeit első lépésben egy alacsony detergens tartalommal (dodecil-maltozid) szolubilizálva, „natív” gélen való futtatással választják el egymástól, majd a második lépésben egy denaturáló gélben az elválasztott komplexek fehérje alegységei is láthatóvá válnak. A gélek hagyományos festési módszerekkel, valamint radioaktívan jelölt metionin beépülése révén röntgenfilmek segítségével is előhívhatóak.

A PG jelenlétben nevelt *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutánsból izolált tilakoid membránok esetében a nagyobb méretű komplexek, mint a PSII dimerek, vagy PSI trimerek, illetve ezek monomer formái egyértelműen elkülönülnek a géleken. A módszer sajátágaiból fakadóan a PSII monomer formái között találhatóak PsbO kötő, és anélküli formák is. Ugyanezekben a mintákban a második dimenziót követően a PSII komplexek alegységei közül a legfontosabbak is láthatóak, melyek a CP43, CP47, D1, D2 (**18a. ábra**). A fehérjék egy jelentős része szabad, komplexbe be nem épült frakciót alkot, mely a natív gél alján gyűlik össze. A PG jelenlétben nevelt mutánsok esetében az autoradiogrammon

látható szabad fehérjék között nem találhatók meg a PSII legfontosabb alegységei (D1, D2), valamint a PSII dimerekben/monomerekben jól láthatóan jelölődnek az újonnan szintetizált fehérjék a hozzáadott radioaktív metionin beépülése miatt (**18c. ábra**).

Bogos et al. 2010



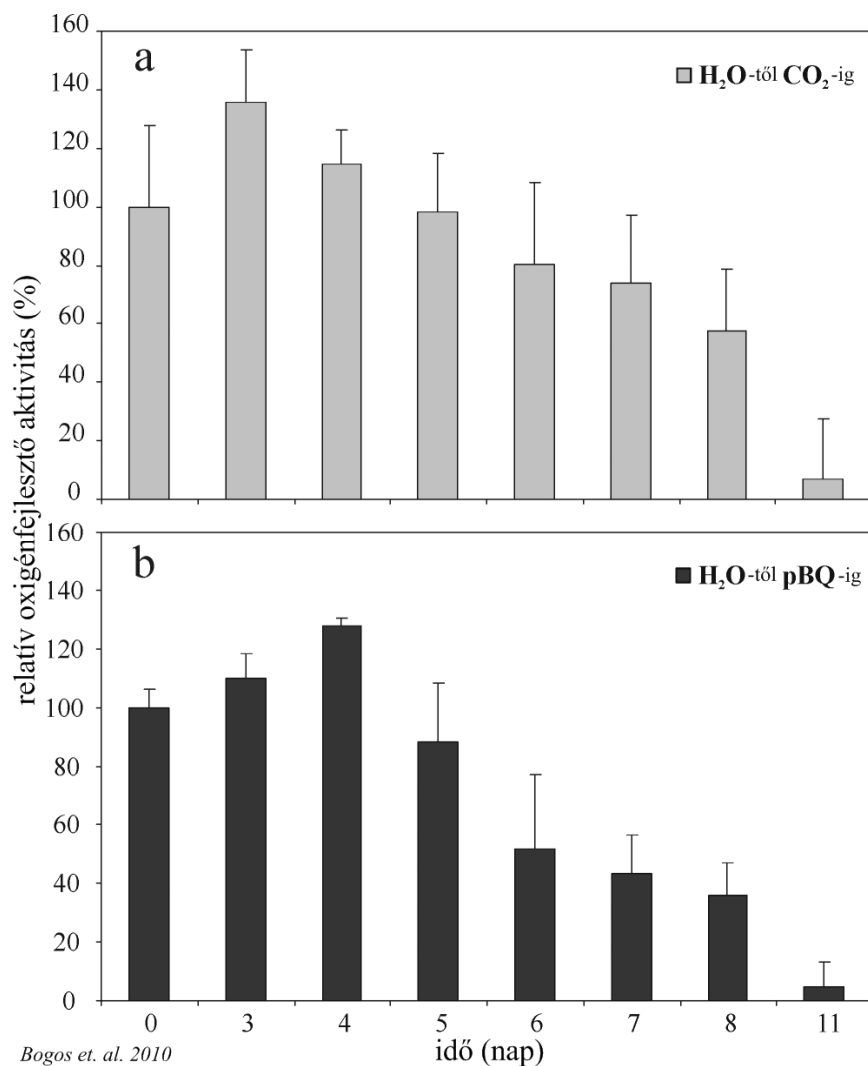
18. ábra: 2 dimenziós BN-SDS/poliakrilamid gélelektroforézis radioaktívan jelölt, majd *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutánsból izolált tilakoid membránokon PG jelenlétében (PG+) és 5 napos PG megvonást követően (PG-). A felső panelek Coomassie festett géleket (a,b), az alsók ugyanazon gélek autoradiogramjait mutatja be. (c, d) Rövidítések: PSI(3), PSI(1) a PSI központi komplexének trimer, illetve monomer formáit jelöli. PSII(2), PSII(1) a PSII dimer, illetve monomer formáját jelöli. Minden esetben 6 μ g klorofillt tartalmazó minták kerültek a gélekre.

5 nap PG éhezést követően a mutánsból izolált tilakoid membránban jelentős mértékben csökken a PSI trimerek, és a PSII dimerek mennyisége. A PSI monomerek mennyisége megnő, illetve a PSII monomerek között is megjelenik egy olyan változat, mely sem PsbO, sem pedig CP43/47 alegységeket nem tartalmaz (**18b. ábra**). Az 5 napos

PG éheztetett mintákból készült autoradiogrammon erősen jelölődik a PSII monomer formája, valamint a D1 fehérje egy felhalmozódó mennyisége, amely nem képes beépülni a PSII komplexekbe (**18c. ábra**). Mindez arra utal, hogy 5 nap PG megvonást követően újonnan szintetizálódó D1 fehérje mutatható ki a sejtekből, viszont ez az alegység felhalmozódik a mintákban és különválik az összeszerelődött komplexektől. Az összeszerelődött PSII komplexek esetében pedig csak monomerek izolálhatóak a membránból (**18d. ábra**). A PG-nek tehát jelentős szerepe van a PSI és a PSII komplexek oligomerizációjában, valamint a D1 fehérje beépülésében a PSII komplexbe.

4. 6. A PG szerepe a *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns oxigén fejlesztő aktivitásában

A mutáns oxigénfejlesztő aktivitása jelentősen csökken PG megvonás hatására. Az első 4 nap PG éhezés során mind a teljes oxigénfejlesztő aktivitás (víz→CO₂), mind pedig a PSII saját aktivitása (víz→pBQ-mesterséges kinonszámazék) a PG-vel kiegészített tápoldatban növekedő sejtekéhez hasonló, nem mutat jelentős defektust. Az 5. naptól kezdődően mindkét karakterisztikus aktivitás csökkenni kezd. A PSII saját aktivitására komolyabb hatással van a PG hiány, mint a teljes oxigénfejlesztő képességre. Az 5. napot követően az oxigénfejlesztő aktivitások folyamatosan csökkennek a PG jelenlétében nevelt kultúrákhoz képest. 11 napos PG megvonás hatására mindkét jellemző oxigénfejlesztő aktivitás drámai különbségeket mutat a PG-vel ellátott kontrollokhoz képest (a kiindulási 10%-a), ami arra utal, hogy a PG elengedhetetlen faktora a normálisan működő fotoszintetikus apparátusnak (**19. ábra**).



19. ábra: A *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ kultúrák oxigénfejlesztő aktivitásának követése a PG éhezés során. A fejlesztő aktivitás mérése során az elektronok (a) a teljes elektrontranszport láncban végighaladnak ($\text{víz} \rightarrow \text{CO}_2$), valamint (b) mesterséges elektronakceptor hozzáadásával a PSII QB helyére bekötődő pBQ-ig jutnak el. A PG éhezést megelőző 100%-os aktivitás abszolút értéke: $124 \mu\text{mol O}_2 \text{ mg Chl}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

4. 7. A PG megvonás hatása a flash-indukált fluoreszcencia lecsengés kinetikájára

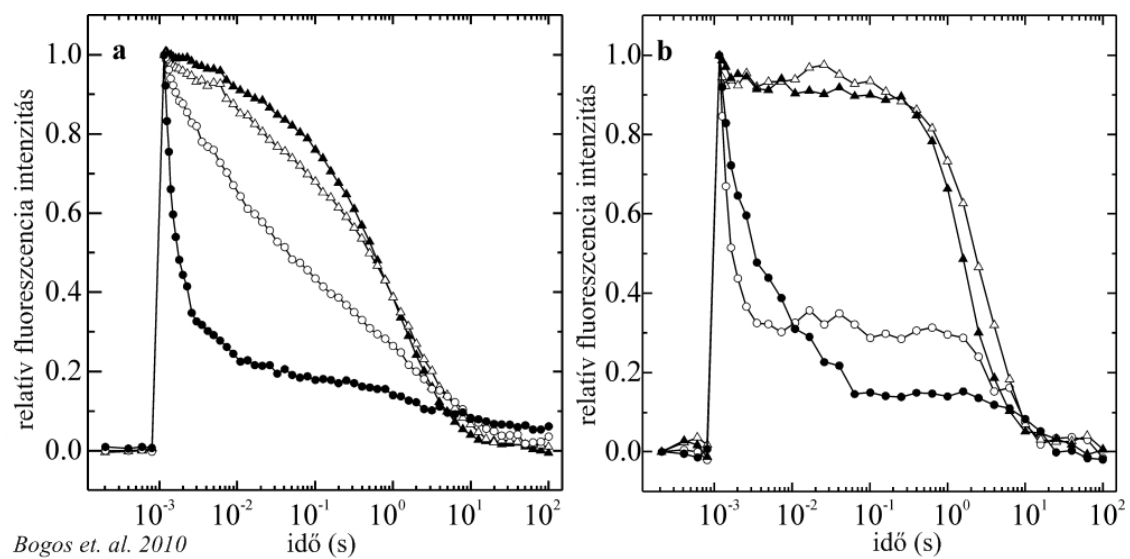
Sötét adaptált mintákban egyetlen, telítő felvillanásnyi megvilágítás elegendő a PSII elsődleges elektronakceptor kinonjának gyors redukálódásához (Q_A^-). A mintákból felszabaduló fluoreszcencia mérésekor ez a redukció egy nagyon gyorsan megjelenő ún.

változó fluoreszcencia emisszió megjelenéséhez vezet. Ennek a változó intenzitású fluoreszcencia emisszióknak a lecsengési kinetikáját követve meghatározhatóak a Q_A^- visszaoxidálódásának módozatai, azaz követhetővé válik a fotoszintetikus elektronok PSII komplexen belüli haladása. Ha ebben a relaxációs kinetikában bármilyen változás észlelhető PG megvonás hatására, az egyértelmű jele annak, hogy a PG nem csak strukturális szempontból fontos szabályozóeleme a PSII környezetének. Vad típusú *Synechocystis* sp. PCC6803 esetében részletesen meghatározhatóak a flash-indukált fluoreszcencia lecsengés jellemzői.¹⁰⁷

Synechocystis sp. PCC6803/ Δ *pgsA* mutáns kultúrák esetében PG jelenlétében és PG éhezés során kimértük vajon van-e a PG hiányának valamilyen hatása a flash-indukált fluoreszcencia lecsengési kinetikájára. PG jelenlétében nevelt kultúrák esetében a lecsengés kinetikája a vad típusú mintákhoz hasonlít, azaz a lecsengési görbét az 500 μ s-os féléletidejű, gyors komponens dominálja, ami a $Q_A^- \rightarrow Q_B(Q_B^-)$ kinonakceptoron keresztül megvalósuló reoxidációjának felel meg. A középső 3-5 ms-os tartomány fluoreszcenciája olyan reakciócentrumokból származik, melyek nem kötöttek plasztokinon molekulát (PQ) a fényfelvillanás időpontjában, ezért a Q_A^- reoxidációja előtt a plasztokinon készletből egy PQ molekula kötődésére van szükség. Végül a lassú fázis fluoreszcenciája olyan reakciókhoz köthető a PSII komplexen belül, ahol a már redukált $Q_A Q_B^-$ -ről az elektron visszafelé egy $Q_A^- Q_B$ egyensúlyi fázison keresztül a vízbontó komplex S2 fáziséval rekombinálódik **(20a. ábra)**. A PG hiányában nevelt sejtek esetében a különbség szembeötlő. 7 nap PG éhezést követően a lecsengés középső fázisa jelentősen lelassul, ami a $Q_A^- \rightarrow Q_B$ elektronátmenet jelentős gátlásának tudható be **(20a. ábra)**. Egy gyakran alkalmazott herbicid molekula, 3-(3, 4-diklórfenil)-1, 1'-dimetilurea (DCMU) jelenlétében a PG éheztetett mintákból származó görbéken nem látható jelentős eltérés a PG jelenlétében neveltekéhez képest. Ez az eredmény arra utal, hogy a PG megvonás nem befolyásolja jelentősen a PSII elektrondonor oldalának működését **(20a. ábra)**.

Ugyanez a mérés *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns esetében eltérő eredményeket mutat. 7 nap PG éhezést követően a lecsengés gyors fázisa nemhogy lelassul a mutánsban, hanem éppenhogy felgyorsul a PG jelenlétében nevelt mintákhoz képest **(20b. ábra)**. A görbék lassú fázisa esetében a PG hiányos minták fluoreszcencia amplitúdója magasabb volt kontrollhoz képest, valamint a lecsengés ideje rövidebbnek mutatkozott.

Ezek az eredmények a Q_B kötőhelyének módosulásával magyarázhatóak, amelynek eredményeképpen a redukált Q_A^- felhalmozódik, és a $Q_A^-Q_B/Q_AQ_B^-$ egyensúlyi állandó jelentősen eltolódik a $Q_A^-Q_B$ állapot irányába. DCMU jelenlétében a lecsengési görbékben nem mutatkozott jelentős különbség, ami szintén a PSII donor oldalnak normális működésére utal mind a PG éheztetett, mint a PG jelenlétében nevelt minták esetében (20b. ábra).



20. ábra: A flash-indukált klorofill fluoreszcencia lecsengésének kinetikája (a) *Synechocystis* sp. PCC6803/ Δ *pgsA* és (b) *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns kultúrák esetében. A mérések egyszeri, telítő felvillanással történő gerjesztést követően PG jelenlétében nevelt kultúráknál DCMU hozzáadásával (▲), illetve nélküle (●), valamint 7 nap PG éhezést követően DCMU jelenlétében (Δ), vagy nélküle készültek (○).

5. Az eredmények megvitatása

A PG szerepének általánosabb megértése érdekében az obligát fotoautotróf *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ cianobaktériumban az alább következő fiziológiai karakterizáció történt meg. A korábbi cianobakteriális modellekkel összevethető eredmények születtek, de a megállapított különbségek rávilágítanak a PG szerepének fajspecifikus aspektusaira. A korábbi, szinte az összes fotoszintetikus organizmusra extrapolált eredmények tükrében megállapítható, hogy a *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutáns esetében mind általános, mind specifikus funkciókat sikerült leírni. Az általános aspektusok között a PG esszenciális szerepe ebben a cianobaktériumban is bizonyított az SQDG-vel ellentétben. A specifikus hatások hátterében valószínűleg a fotoszintetikus apparátus olyan apró, szerkezetbeli különbségei húzódnak, meg melyek eddig ismeretlenek voltak, hiszen a legnagyobb felbontású PSII kristályszerkezeti modellek is egy hipertermofil cianobaktérium alkalmazásával születtek. Ezek a szerkezeti különbségek pedig adódhatnak a cianobakteriális törzsek nagymértékű filogenetikai diverzitásából is, melyek egy-egy törzs, vagy akár okótípus esetén is jelenthetnek szekvencia különbségeket a vizsgált gének kódolta fehérjék esetében. A *Synechocystis* sp. PCC6803 zsírsavösszetétele a magasabbrendű növények kloroplasztiszainak zsírsavösszetételéhez nagyon hasonló, ugyanakkor a *Synechococcus* sp. PCC7942 lipidjei inkább baktériumokra jellemző, egyszerűen telítetlen zsírsavdalláncokkal rendelkeznek. Ez a markáns különbség a deszaturációs jellemzőkben, valamint az SQDG esszenciális szerepe *Synechocystis* sp. PCC6803 cianobaktériumban megkérdőjelezheti az anionos lipidek szerepének általánosítását fotoszintetikus szervezetekben.

5. 1. A PG kiürülés hatásai a *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns növekedési tulajdonságaira és pigment összetételére

A *Synechococcus* sp. PCC7942 *cdsA* génjének inszerciós mutagenézise egy olyan mutáns törzs létrejöttét eredményezte, amely nem képes PG szintézisére. A tápoldathoz mesterségesen adagolt dioleoil-PG (18:1) képes volt a letális mutáció hatását kompenzálni, jelenlétében a törzs növekedése a vad típusú kontroll törzshöz nagyon hasonló volt. Hasonló mutánsokban korábban is vizsgálták a kívülről adagolt PG kiürülésének jellegzetes hatásait *Synechocystis* sp. PCC6803 Δ *cdsA*, Δ *pgsA*, PAL Δ *cdsA* törzsek esetében.^{73,74,84} A PG hozzáadása a tápfolyadékhoz ezekben az esetekben is képes volt kompenzálni a letális mutáció hatását, ami arra utal, hogy a vizsgált cianobaktériumok esetében a fotoautotróf növekedéshez elengedhetetlen a PG jelenléte a membránokban (**12. ábra**)

Hasonlóan a *Synechocystis* mutánsokhoz a *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns klorofilltartalma is jelentős változásokon megy keresztül PG éhezés hatására. Leglátványosabban spektroszkópiai módszerek alkalmazásával feltűnő, hogy PG éhezés hatására a sejtekben található fikobiliproteinek és klorofill relatív aránya az intracelluláris klorofilltartalom jelentős csökkenésére utal, míg korábbi mérések alapján a fikobiliproteinek mennyisége nem változik jelentősen rövid távú PG éhezés hatására (**15. ábra**).⁷⁷ A *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns növekedése korábban gátlódik PG megvonás hatására, mint a *Synechocystis* sp. PCC6803/ Δ *pgsA* mutánsé, ami arra enged következtetni, hogy azonos nevelési feltételek mellett a PG hiánya súlyosabb következményekkel jár az előbbi mutáns fiziológiai folyamataiban (**13. és 14. ábra**). Korábban a *Synechocystis* sp. PCC6803/ Δ *cdsA* mutáns növekedési tulajdonságait vizsgálva hasonló eredmények születtek, viszont a nevelési körülmények nagymértékű különbsége nem engedte meg a két törzs ilyen szintű összehasonlítását.^{74,73} A sejtek szaporodásának teljes gátlása is előbb jelentkezik a *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns esetében, mint a *Synechocystis* sp. PCC6803/ Δ *pgsA* mutáns PG éhezése során. Ez a tény még akkor is igaz, ha a két mutáns növekedési sebessége eltérő, hiszen a *Synechocystis* sp.

PCC6803/ Δ *pgsA* mutáns kultúrák PG éhezés során több duplázódásra képesek, mint a *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* kultúrák. A PG újbóli hozzáadása az éhező kultúrákhoz a *Synechocystis* mutáns esetében visszafordította a PG kiürülés reverzibilis negatív hatásait 21 napja éhező kultúrák esetében is, ellenben a *Synechococcus* mutáns éhező kultúráiból eltűnnek az élő sejtek 13 napos PG megvonást követően (13. és 14. ábra).

5. 2. A PG éhezés hatása a *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns lipidösszetételére és a lipidek zsírsavtartalmára

A PG mennyiségének változása gázkromatográfiás módszerekkel követhető a *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns PG éhező kultúráiban. Két sejtsztódást követően (a kultúra fehéjre tartalmának két duplázódása) a PG tartalom negyedére esett vissza az izolált lipid frakcióban. Ezt a csökkenést egy jelentős SQDG növekedés követte, amely valószínűleg a PG kieső funkciót pótolta egy ideig PG éhezés során (17. ábra). Korábbi eredmények alapján feltételezhető, hogy a PG mennyiségének csökkenése természetes foszfátéhezés során kompenzálódik a megemelkedett SQDG mennyiségével *Arabidopsis thaliana* esetében, mely a membránok teljes negatív töltésének megőrzése érdekében történik.¹⁰⁸ Ugyanakkor *Chlamydomonas reinhardtii* szulfát éhezése során a PG mennyiségének enyhe növekedése figyelhető meg, ami továbbra is arra utal, hogy a PG és SQDG képesek egymás szerepét részlegesen átvenni fotoszintetikus membránokban.¹⁰⁹

A zsírsavösszetétel elemzése során kiderült, hogy a kívülről a tápoldatba adagolt dioleoil-PG (18:1) olajsavtartalma fokozatosan ürül ki a sejtekből és a PG éheztetett kultúrákból kivont PG-ből. Az olajsav helyett végül palmitinsav (16:0) halmozódik fel az izolált PG-ben míg az összes többi lipidosztály esetében nem figyelhető meg ez a folyamat. A membránban található lipidek zsírsavösszetételének ilyen mértékű változását korábban *Synechococcus elongatus* nitrát éhezése során írták le, illetve a legújabb eredmények alapján *Synechocystis* sp. PCC6803/ Δ *pgsA* mutánsban is megtalálható a lipidek ilyen szintű átalakításának képessége.^{110,106} A folyamat okára még nem sikerült magyarázatot találni, valamint az enzimekészlet, amely a biológiai katalízist végzi még nem teljesen

feltérképezett, de a lipidek ilyen mértékű átalakításának képessége a két cianobakteriális törzsben is rámutat a jelenség fontosságára. A folyamat hátterében valószínűleg az áll, hogy a kívülről adagolt dioleoil-PG (18:1) egyszerűen telítetlen olajsav oldalláncai nem teljesen megfelelőek a sejtekben a PG-t észtereszítő, természetes formában jelen levő sn-2 (16:0), sn-1 (18:0) zsírsavakkal szemben.⁴² Ennek megfelelően egy viszonylag lassú, aktív enzimatis lépések során az sn-2 pozícióban található olajsav kicserélődik palimitinsavra, valamint az sn-1 pozícióban található olajsav sztearilsavra. Az ilyen módon - szerkezeti szempontból - vad típushoz közelebbi PG kerül a strukturális szempontból fontos hatóhelyekre.

5. 3. A PG hatása a PSII alegységeinek szintézisére és összeszerelődésére *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* cianobaktériumban

A *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* izolált tilakoid membránok kétdimenziós elektroforetikus vizsgálata alapján hasonló eredmények születtek, mint korábban a *Synechocystis* sp. PCC6803/PAL Δ *cdsA* mutáns vizsgálata során.⁸⁴ A PG hiányában nevelt sejtekből izolált tilakoidokban az oligomerizáció mértékének csökkenése mindkét törzs esetében megfigyelhető, valamint a monomerizáció korábban jelentkezik a *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns esetében rámutatva, hogy a PG ebben törzsben vélhetően sokkal fontosabb strukturális elem a fotokémiai rendszerek összeszerelődése és stabilizációja során. Ezeken túlmenően nagy mennyiségű be nem épült D1 fehérje halmozódik fel a PG éheztetett *Synechococcus* mutánsban, azaz a PG nem csak a reakciókomplexek oligomer struktúrájának stabilitását, hanem az újonnan szintetizált membránfehérjék tilakoidba épülését is befolyásolhatja (**18. ábra**).

Jelentős különbség viszont, hogy a *Synechocystis* sp. PCC6803 PAL/ Δ *cdsA* mutáns izolált tilakoid mintáiban inkább a CP43 leszakadása figyelhető meg 20 napos PG megvonás hatására. Ez a leszakadás a PSII reakciócentrumról magyarázható a röntgen kristallográfiás vizsgálatokban a CP43 és D1 fehérjealegységek között azonosított PG molekula, a PG kiürülést követő hiányára.⁸⁹ A leválás *in vivo* is kimutatható fluoreszcencia indukciós spektrumok alapján, viszont nem teljes, ugyanis az izolált tilakoid

membránokban nem mindegyik PSII reakciókomplexről történik meg a CP43 leszakadása. Inkább a teljes PSII és a CP43 alegység nélküli ún. RC47 aránya változik meg PG éhezés hatására a PG jelenlétében nevelt sejtekben azonosított állapothoz képest.⁸⁴

A tilakoid nagyméretű fehérjekomplexeit tekintve mindkét mutánsnál a PSII dimerek és PSI trimerek erős monomerizációja figyelhető meg, ami a reakciókomplexek általános destabilizációjának a jele (**18. ábra**). A legújabb eredmények megkérdőjelezzik azt az általánosan elfogadott tényt, hogy a PSII *in vivo* dimer formában van jelen a tilakoid membránokban, valamint a PSII stabil dimerek létrejöttéért az izolálásuk során hozzáadott detergens molekulákat (dodecil-maltozid) teszik felelőssé. Ezekben a kísérletekben a PSII izolálása során megállapítható volt a detergens jelenlétének és koncentrációjának hatása az izolált PSII oligomerizációs fokának kialakulásában. A meglepő konklúzió szerint a PSII dimerizáció erősen függ az izolálás során alkalmazott detergens minőségétől és koncentrációjától.^{82,83} A tilakoid izolálása közben alkalmazott detergens tehát mesterségesen fokozhatják a PSII dimerizációt. Rövid PG éhezést követően (5 nap) a *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutánsban azonban még a detergens jelenléte ellenére sem mutatható ki PSII dimer.

5. 4. A PG kiürülés hatása a *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutáns fotoszintetikus aktivitására

A PG kiürülése mindegyik PG szintézisére képtelen mutáns cianobaktériumban hatással volt a sejtek fotoszintetikus aktivitására. *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ esetében 9 nap PG éhezést követően a fotoszintetikus oxigéntermelés a kiindulási 60%-ára esett vissza.⁷³ *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutáns esetében a PG megvonás hatása még súlyosabbnak mutatkozott, hiszen 11 nap PG éhezést követően a fotoszintetikus oxigéntermelés aktivitása a kiindulási 10%-át sem érte el (**19. ábra**). A *Synechocystis* mutáns esetében a PG hiányának hatásai 21 napos PG éhezést követően is reverzibilisek voltak, míg a *Synechococcus* $\Delta cdsA$ mutáns 13 nap alatt visszafordíthatatlanul elveszítette életképességét és a PG visszaadását követően sem található élő sejt a kultúrákban (**13b. és 14b. ábra**). A PG megvonás ilyen drasztikus hatásait tekintve a *Synechococcus* sp.

PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutáns sok tekintetben hasonló a *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta cdsA$ mutánsra annak ellenére, hogy a nevelési körülmények közötti lényeges különbségek megnehezítik a két törzs azonos mutációjának összehasonlítását.⁷⁴

Flash indukált fluoreszcencia mérésekkel bizonyítottuk, hogy a *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutánsok PSII szerkezete olyan változásokat szenved PG éhezés során, amely megváltoztatja a elektrontranszport komponensek egyensúlyi állandóit, azonban közvetlen gátlást nem okoznak. Az elektronátmentek kinetikájának megváltozása pedig gátlásként jelentkezik mind az oxigénfejlesztésben, mind pedig a DCMU nélkül mért, változó fluoreszcencia intenzitások lecsengésében (**19b.**, **20b. ábra**). Mivel DCMU nélkül a gyors fázis féléletideje nem változik jelentősen, ezért a Q_A és Q_B közötti közvetlen gátlás nem magyarázza a kapott lecsengési görbéket. Sokkal valószínűbb, hogy a Q_A - Q_B és Q_A - Q_B átmeneti állapotok közötti egyensúlyi állandó (PG jelenlétében 1:10 arányban találhatók meg ezek az állapotok a Q_A - Q_B javára) csökken le, amely a redukált Q_A -visszaoxidálódásának útvonalát fordítja meg. Ez a visszaoxidálódás végül a vízbontó komplex S_2 állapotával történő rekombinációval valósul meg, mely folyamat sokkal lassabban megy végbe, mint a Q_A - Q_B elektronátmenet, megnövelve ezzel a középső és lassú fázis fluoreszcenciájának féléletidejét (**20b. ábra**). DCMU hozzáadásával mesterségesen gátolható a Q_A - Q_B elektronátmenet. A DCMU jelenlétében mért lecsengési görbék PG hiányában és jelenlétében is ugyanazt a kinetikát követték. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a PSII donor oldalán nem következett be destabilizáló változás 7 nap PG éhezést követően, hiszen a fluoreszcencia lecsengés féléletideje sehol sem csökken a PG jelenlétében mért mintához képest (**20b. ábra**).

Synechocystis sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ mutánsban a PSII belső elektrontranszportja erősen gátolt (**20a. ábra**). A fluoreszcencia lecsengés görbéjén a gyors és középső fázis lecsengésének féléletideje nő meg, amely a Q_A és Q_B elektronakceptorok közötti átmenet közvetlen gátlására utal. Az elektronátmenet közvetlen gátlása a Q_A -visszaoxidációjának útvonalát csak a vízbontó komplex S_2 állapotával történő rekombinációval teszi lehetővé, megnövelve ezzel a DCMU nélküli fluoreszcencia lecsengés mindhárom fázisának féléletidejét (**20a. ábra**). DCMU jelenlétében a *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ mutánsnál nagyon enyhe csökkenést észleltünk a lecsengés féléletidejében (**20a. ábra**). Ezt a csökkenést a PSII donor oldalának enyhe destabilizációja okozhatja, mivel a DCMU-val

gátolt Q_A - Q_B elektronátmenet következtében a Q_A - reoxidációja nem csak a vízbontó komplex S2 állapotával történő töltésrekombinációval valósul meg, hanem a vízbontó komplex más, destabilizált komponensei felé is terelődhet a reoxidáció útvonala. *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ mutáns cianobaktériumban korábbi mérések is bizonyították a Q_A - Q_B elektronátmenet gátlását PG hiányában.⁷⁵

A tilakoid membrán galaktolipidtartalma az anionos lipidektől eltérően befolyásolja a PSII fotoszintetikus elektrontranszportját. A DGDG szerepét a flash-indukált fluoreszcencia mérésével korábban részletesen tanulmányozták a DGDG szintézisében mutáns *Arabidopsis thaliana* esetében. A mutáns növényekben a plasztisz eredetű DGDG 90%-a hiányzik a rendeltetési helyéről, aminek következtében a flash-indukált fluoreszcencia kvantumhatásfok jelentősen romlott. A DGDG hiánya ezekben a mutánsokban jelentős strukturális következményekkel járt főleg a PSII donor oldalán, aminek következtében a mutáns növényekből származó levelek sokkal érzékenyebbek voltak hőstressz kezelésre, mint a vad típusú kontrollnövények. Ugyanakkor a PSII akceptor régióiban nem következik be jelentős változás, azaz a PSII Q_A^- elektronakceptor különféle visszaoxidálódási folyamatait a DGDG hiánya nem befolyásolja.¹¹¹ A DGDG szintézisére képtelen *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta dgdA$ mutáns vizsgálata során is a PSII donor oldal destabilizációját figyelték meg, tehát a neutrális DGDG inkább a PSII donor oldalának szerkezeti integritásának fenntartásában játszik szerepet.

Korábbi információk alapján a tilakoidban található másik anionos lipid, az SQDG nem esszenciális komponense a fotoszintetikus apparátusnak.^{69,66} Annak ellenére, hogy mennyisége megemelkedik PG éhezés során, nem képes kompenzálni teljes mértékben a kieső PG miatt kialakuló káros hatásokat. Ennek megfelelően kijelenthető, hogy a tilakoid PG tartalma esszenciális a fotoszintetikus apparátus megfelelő működése szempontjából *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutáns esetében. Az eredmények tükrében belátható, hogy a tilakoid membránok teljes negatív töltésének SQDG+PG által meghatározott értéke állandó. A PG hiányt a sejt az SQDG koncentrációjának emelésével kompenzálja, de ez nem elegendő a sejtek fotoautotróf növekedésének fenntartásához.

6. Összefoglalás

A munka eredményei alapján a következő konklúziók vonhatóak le.

1. Létrehoztuk a *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutánst, mely képtelen a PG szintézisére és esetében a PG megvonás súlyosabb következményekkel jár, mint a *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$, illetve PAL/ $\Delta cdsA$ mutáns esetében.
2. A PG kiürülés jelentősen megváltoztatja a sejtek lipidösszetételét. A PG megvonás hatására az SQDG mennyisége számottevően megnövekszik, valamint a kívülről a kultúrákhoz adagolt szintetikus dioleoil-PG (18:1) átalakul a sejtekben eredetileg megtalálható zsírsavakkal észtereszített, vad típushoz közelebbi PG molekulákká. Azonban sem a megemelkedett SQDG tartalom, sem pedig a PG átalakított zsírsavtartalma nem képes kompenzálni a PG mennyiségének drasztikus csökkenéséből fakadó negatív hatásokat.
3. A PG kiürülés jelentős hatással van a tilakoid membránokban található fotoszintetikus reakciócentrumok (PSI, PSII) oligomerizációjára. Rövidtávú PG megvonás hatására az eredetileg dimer, trimer formában jelen levő szuperkomplexek esetében jelentős monomerizáció figyelhető meg. A fehérjeszintézis ilyen rövidtávú PG éhezés hatására nem gátlódik ugyan, de az újonnan megszintetizálódott reakciócentrum alegységek összeszerelődése jelentős gátlást szenved, főleg a PSII esetében. Igen valószínű tehát, hogy a tilakoid membránban megtalálható PG aktív szerepet vállal az újonnan szintetizálódott fehérjék membránba ágyazódásában.
4. *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ sejtek esetében a fotoszintetikus aktivitás gyors csökkenése figyelhető meg PG megvonás hatására. Ez a csökkenés jórészt a PSII akceptor oldali gátlásának köszönhető, míg a PSII donor oldalán nem figyelhető meg jelentős változás a PG jelenlétében nevelt kontrollokhoz képest. Ugyanakkor

Synechocystis sp. PCC6803/ Δ *pgsA* mutánssal ellentétben az oxigénfejlesztő aktivitás nem a PSII elsődleges és másodlagos (Q_A/Q_B) kinon akceptorai közötti elektronátmenet gátlásával valósul meg. Sokkal inkább a lecsökkent egyensúlyi állandónak köszönhető a $Q_A^-Q_B$ és $Q_AQ_B^-$ elektronállapotok között.

7. Idézett közlemények

1. **Whitton, B. & Potts, M.** *The Ecology of Cyanobacteria - Their Diversity in Time and Space*. (Springer: 2000).
2. **Tomitani, A., Knoll, A.H., Cavanaugh, C.M. & Ohno, T.** The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular–phylogenetic and paleontological perspectives. **103**, 5442-5447 (2006).
3. **Simon, N., Cras, A., Foulon, E. & Lemée, R.** Diversity and evolution of marine phytoplankton. *Comptes Rendus Biologies* **332**, 159-170 (2009).
4. **Field, C.B., Behrenfeld, M.J., Randerson, J.T. & Falkowski, P.** Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* **281**, 237-240 (1998).
5. **Bhattacharya, D.** *Origins of Algae and Their Plastids*. (Springer: 2003).
6. **Martin, K. et al.** Cyanobacterial signature genes. *Photosynthesis Research* **75**, 211-221 (2003).
7. **Garrrity, G.M.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. (Springer: 2001).
8. **Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. & Stanier, R.Y.** Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J Gen Microbiol* **111**, 1-61 (1979).
9. **Robertson, B., Tezuka, N. & Watanabe, M.** Phylogenetic analyses of Synechococcus strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 861-871 (2001).
10. **Martin, W. et al.** Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 12246-12251 (2002).
11. **Eugene V. Koonin, Kira S. Makarova & L. Aravind** HORIZONTAL GENE TRANSFER IN PROKARYOTES: Quantification and Classification. *Annual Review of Microbiology* **55(1)**, 709-742 (2001).

12. **Zhang, C., Jeanjean, R. & Joset, F.** Obligate phototrophy in cyanobacteria: more than a lack of sugar transport. *FEMS Microbiology Letters* **161**, 285-292 (1998).
13. **Bryant, D.** *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. (Springer: 2007).
14. **Shestakov, S.V. & Khyen, N.T.** Evidence for genetic transformation in blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Molecular and General Genetics MGG* **107**, 372-375 (1970).
15. **Kaneko, T. et al.** Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions. *DNA Res* **3**, 109-136 (1996).
16. **Golden, S.S., Nalty, M.S. & Cho, D.S.** Genetic relationship of two highly studied *Synechococcus* strains designated *Anacystis nidulans*. *J. Bacteriol.* **171**, 24-29 (1989).
17. **Chen, Y., Kay Holtman, C., Magnuson, R.D., Youderian, P.A. & Golden, S.S.** The complete sequence and functional analysis of pANL, the large plasmid of the unicellular freshwater cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Plasmid* **59**, 176-192 (2008).
18. **Liberton, M., Howard Berg, R., Heuser, J., Roth, R. & Pakrasi, H.B.** Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Protoplasma* **227**, 129-138 (2006).
19. **Menke, W.** Structure and Chemistry of Plastids. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **13**, 27-44 (1962).
20. **Shimoni, E., Rav-Hon, O., Ohad, I., Brumfeld, V. & Reich, Z.** Three-Dimensional Organization of Higher-Plant Chloroplast Thylakoid Membranes Revealed by Electron Tomography. *Plant Cell* **17**, 2580-2586 (2005).
21. **Nierzwicki-Bauer, S.A., Balkwill, D.L. & Stevens, S.E.** Heterocyst differentiation in the cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *J. Bacteriol.* **157**, 514-525 (1984).
22. **Nevo, R. et al.** Thylakoid membrane perforations and connectivity enable intracellular traffic in cyanobacteria. *EMBO J* **26**, 1467-1473 (2007).
23. **van de Meene, A., Hohmann-Marriott, M., Vermaas, W. & Roberson, R.** The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Archives of Microbiology* **184**, 259-270 (2006).

24. **Sherman, D.M., Troyan, T.A. & Sherman, L.A.** Localization of Membrane Proteins in the Cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 (Radial Asymmetry in the Photosynthetic Complexes). *Plant Physiol.* **106**, 251-262 (1994).
25. **Hoiczky, E. & Hansel, A.** Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope. *J. Bacteriol.* **182**, 1191-1199 (2000).
26. **Herrero, A. & Flores, E.** *The Cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution.* (Caister Academic Press: 2008).
27. **Spence, E. et al.** Membrane-specific targeting of green fluorescent protein by the Tat pathway in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Molecular Microbiology* **48**, 1481-1489 (2003).
28. **Mackie, M.M. & Zilinskas, B.A.** Role of signal peptides in targeting of proteins in cyanobacteria. *J. Bacteriol.* **176**, 1857-1864 (1994).
29. **Chungjatupornchai, W. & Fa-aaroonsawat, S.** Translocation of green fluorescent protein to cyanobacterial periplasm using ice nucleation protein. *The Journal of Microbiology* **47**, 187-192 (2009).
30. **Golecki, J.R.** Studies on ultrastructure and composition of cell walls of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Arch. Microbiol.* **114**, 35-41 (1977).
31. **Scanlan, D.J., Mann, N.H. & Carr, N.G.** Effect of iron and other nutrient limitations on the pattern of outer membrane proteins in the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Archives of Microbiology* **152**, 224-228 (1989).
32. **Huang, F. et al.** Isolation of Outer Membrane of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and Its Proteomic Characterization. *Mol Cell Proteomics* **3**, 586-595 (2004).
33. **Vothknecht, U.C. & Westhoff, P.** Biogenesis and origin of thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1541**, 91-101 (2001).
34. **Serrano, A., Gimenez, P., Schmidt, A. & Sandmann, G.** Immunocytochemical localization and functional determination of phytoene desaturase in photoautotrophic prokaryotes. *J Gen Microbiol* **136**, 2465-2469 (1990).
35. **Wada, H. & Murata, N.** Membrane Lipids in Cyanobacteria. *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics* 65-81 (2004).
36. **Sato, N. & Wada, H.** Lipid Biosynthesis and its Regulation in Cyanobacteria. *Lipids in Photosynthesis* 157-177 (2009).

37. **Nugent, J.H.A.** Oxygenic Photosynthesis. *European Journal of Biochemistry* **237**, 519-531 (1996).
38. **Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J.L. & Cramer, W.A.** Structure of the Cytochrome b₆f Complex of Oxygenic Photosynthesis: Tuning the Cavity. *Science* **302**, 1009-1014 (2003).
39. **Allen, J.F.** Photosynthesis of ATP--Electrons, Proton Pumps, Rotors, and Poise. *Cell* **110**, 273-276 (2002).
40. **Gombos, Z. et al.** Genetic Enhancement of the Ability to Tolerate Photoinhibition by Introduction of Unsaturated Bonds into Membrane Glycerolipids. *Plant Physiol.* **115**, 551-559 (1997).
41. **Siegenthaler, P.** Molecular Organization of Acyl Lipids in Photosynthetic Membranes of Higher Plants. *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics* 119-144 (2004).
42. **Murata, N., Wada, H. & Gombos, Z.** Modes of Fatty-Acid Desaturation in Cyanobacteria. *Plant Cell Physiol.* **33**, 933-941 (1992).
43. **Hölzl, G. & Dörmann, P.** Structure and function of glycoglycerolipids in plants and bacteria. *Progress in Lipid Research* **46**, 225-243 (2007).
44. **Dörmann, P., Balbo, I. & Benning, C.** *Arabidopsis* Galactolipid Biosynthesis and Lipid Trafficking Mediated by DGD1. *Science* **284**, 2181-2184 (1999).
45. **Awai, K. et al.** Comparative Genomic Analysis Revealed a Gene for Monoglucosyldiacylglycerol Synthase, an Enzyme for Photosynthetic Membrane Lipid Synthesis in Cyanobacteria. *Plant Physiol.* **141**, 1120-1127 (2006).
46. **Sato, N. & Murata, N.** Lipid Biosynthesis in the Blue-Green Alga (Cyanobacterium), *Anabaena variabilis* III. UDPglucose:Diacylglycerol Glucosyltransferase Activity in vitro. *Plant Cell Physiol.* **23**, 1115-1120 (1982).
47. **Balogi, Z. et al.** "Heat shock lipid" in cyanobacteria during heat/light-acclimation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **436**, 346-354 (2005).
48. **Awai, K., Watanabe, H., Benning, C. & Nishida, I.** Digalactosyldiacylglycerol is Required for Better Photosynthetic Growth of *Synechocystis* sp. PCC6803 Under Phosphate Limitation. *Plant Cell Physiol.* **48**, 1517-1523 (2007).
49. **Sakurai, I., Mizusawa, N., Wada, H. & Sato, N.** Digalactosyldiacylglycerol Is Required for Stabilization of the Oxygen-Evolving Complex in Photosystem II. *Plant Physiol.* **145**, 1361-1370 (2007).

50. **Fyfe, P.K., Hughes, A.V., Heathcote, P. & Jones, M.R.** Proteins, chlorophylls and lipids: X-ray analysis of a three-way relationship. *Trends in Plant Science* **10**, 275-282 (2005).
51. **Páli, T., Garab, G., Horváth, L.I. & Kóta, Z.** Functional significance of the lipid-protein interface in photosynthetic membranes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 1591-1606 (2003).
52. **Jones, M.R.** Lipids in photosynthetic reaction centres: Structural roles and functional holes. *Progress in Lipid Research* **46**, 56-87 (2007).
53. **Jarvis, P. et al.** Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8175-8179 (2000).
54. **Dormann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I. & Benning, C.** Isolation and Characterization of an *Arabidopsis* Mutant Deficient in the Thylakoid Lipid Digalactosyl Diacylglycerol. *Plant Cell* **7**, 1801-1810 (1995).
55. **Hölzl, G. et al.** Functional differences between galactolipids and glucolipids revealed in photosynthesis of higher plants. **103**, 7512-7517 (2006).
56. **Hölzl, G., Zahringer, U., Warnecke, D. & Heinz, E.** Glycoengineering of Cyanobacterial Thylakoid Membranes for Future Studies on the Role of Glycolipids in Photosynthesis. *Plant Cell Physiol.* **46**, 1766-1778 (2005).
57. **K. G. Ragothama** PHOSPHATE ACQUISITION. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 665-693 (1999).
58. **Essigmann, B., Güler, S., Narang, R.A., Linke, D. & Benning, C.** Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 1950-1955 (1998).
59. **Domonkos, I., Laczkó-Dobos, H. & Gombos, Z.** Lipid-assisted protein-protein interactions that support photosynthetic and other cellular activities. *Progress in Lipid Research* **47**, 422-435 (2008).
60. **Sparrow, C.P. & Raetz, C.R.** Purification and properties of the membrane-bound CDP-diglyceride synthetase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 12084-12091 (1985).
61. **Dowhan, W.** Phosphatidylglycerophosphate synthase from *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol* **209**, 313-321 (1992).

62. **Wu, F., Yang, Z. & Kuang, T.** Impaired Photosynthesis in Phosphatidylglycerol-Deficient Mutant of Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC7120 with a Disrupted Gene Encoding a Putative Phosphatidylglycerophosphatase. *Plant Physiol.* **141**, 1274-1283 (2006).
63. **Müller, F. & Frentzen, M.** Phosphatidylglycerophosphate synthases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **509**, 298-302 (2001).
64. **Babiychuk, E. et al.** *Arabidopsis* phosphatidylglycerophosphate synthase 1 is essential for chloroplast differentiation, but is dispensable for mitochondrial function. *The Plant Journal* **33**, 899-909 (2003).
65. **Benning, C.** BIOSYNTHESIS AND FUNCTION OF THE SULFOLIPID SULFOQUINOVOSYL DIACYLGLYCEROL. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **49**, 53-75 (1998).
66. **Güler, S., Essigmann, B. & Benning, C.** A Cyanobacterial Gene, *sqdX*, Required for Biosynthesis of the Sulfolipid Sulfoquinovosyldiacylglycerol. *J Bacteriol* **182**, 543-545 (2000).
67. **Frentzen, M.** Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 270-276 (2004).
68. **Yu, B., Xu, C. & Benning, C.** *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 5732-5737 (2002).
69. **Aoki, M., Sato, N., Meguro, A. & Tsuzuki, M.** Differing involvement of sulfoquinovosyl diacylglycerol in photosystem II in two species of unicellular cyanobacteria. *European Journal of Biochemistry* **271**, 685-693 (2004).
70. **Riekhof, W.R., Ruckle, M.E., Lydic, T.A., Sears, B.B. & Benning, C.** The Sulfolipids 2'-O-Acyl-Sulfoquinovosyldiacylglycerol and Sulfoquinovosyldiacylglycerol Are Absent from a *Chlamydomonas reinhardtii* Mutant Deleted in SQD1. *Plant Physiol.* **133**, 864-874 (2003).
71. **Xu, C. et al.** The *pgp1* Mutant Locus of *Arabidopsis* Encodes a Phosphatidylglycerolphosphate Synthase with Impaired Activity. *Plant Physiol.* **129**, 594-604 (2002).
72. **Hagio, M. et al.** Phosphatidylglycerol is Essential for the Development of Thylakoid Membranes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **43**, 1456-1464 (2002).

73. **Hagio, M. et al.** Direct Evidence for Requirement of Phosphatidylglycerol in Photosystem II of Photosynthesis. *Plant Physiol.* **124**, 795-804 (2000).
74. **Sato, N., Hagio, M., Wada, H. & Tsuzuki, M.** Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10655-10660 (2000).
75. **Gombos, Z. et al.** Phosphatidylglycerol Requirement for the Function of Electron Acceptor Plastocyanin QB in the Photosystem II Reaction Center†. *Biochemistry* **41**, 3796-3802 (2002).
76. **Sato, N., Suda, K. & Tsuzuki, M.** Responsibility of phosphatidylglycerol for biogenesis of the PSI complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1658**, 235-243 (2004).
77. **Domonkos, I. et al.** Phosphatidylglycerol Is Essential for Oligomerization of Photosystem I Reaction Center. *Plant Physiol.* **134**, 1471-1478 (2004).
78. **Kern, J. & Renger, G.** Photosystem II: Structure and mechanism of the water:plastoquinone oxidoreductase. *Photosynthesis Research* **94**, 183-202 (2007).
79. **Zouni, A. et al.** Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* **409**, 739-743 (2001).
80. **Kamiya, N. & Shen, J.** Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 98-103 (2003).
81. **Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J. & Iwata, S.** Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center. *Science* **303**, 1831-1838 (2004).
82. **Takahashi, T. et al.** Photosystem II Complex in Vivo Is a Monomer. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 15598-15606 (2009).
83. **Watanabe, M., Iwai, M., Narikawa, R. & Ikeuchi, M.** Is the Photosystem II Complex a Monomer or a Dimer? *Plant Cell Physiol.* **50**, 1674-1680 (2009).
84. **Laczkó-Dobos, H. et al.** Role of phosphatidylglycerol in the function and assembly of Photosystem II reaction center, studied in a *cdsA*-inactivated PAL mutant strain of *Synechocystis* sp. PCC6803 that lacks phycobilisomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1777**, 1184-1194 (2008).

85. **Renger, G.** *Primary Processes of Photosynthesis: Principles and Apparatus (Comprehensive Series in Photochemistry and Photobiology)*. (RSC Publishing: 2008).
86. **Jordan, P. et al.** Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5Å resolution. *Nature* **411**, 909-917 (2001).
87. **Kruse, O. et al.** Phosphatidylglycerol Is Involved in the Dimerization of Photosystem II. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 6509-6514 (2000).
88. **Nishiyama, Y., Allakhverdiev, S.I. & Murata, N.** A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1757**, 742-749 (2006).
89. **Guskov, A. et al.** Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 334-342 (2009).
90. **Güler, S., Seeliger, A., Härtel, H., Renger, G. & Benning, C.** A Null Mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 Deficient in the Sulfolipid Sulfoquinovosyl Diacylglycerol. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 7501-7507 (1996).
91. **Sambrook J, Fritsch, EF, Maniatis, T** *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York: 1989).
92. **Mayer, M.P.** A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**, 41-46 (1995).
93. **Lutz, R. & Bujard, H.** Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucl. Acids Res.* **25**, 1203-1210 (1997).
94. **Golden, S.S. & Sherman, L.A.** Optimal conditions for genetic transformation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *J. Bacteriol.* **158**, 36-42 (1984).
95. **BLIGH, E.G. & DYER, W.J.** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* **37**, 911-917 (1959).
96. **Wada, H. & Murata, N.** *Synechocystis* PCC6803 Mutants Defective in Desaturation of Fatty Acids. *Plant Cell Physiol.* **30**, 971-978 (1989).
97. **Ihlenfeldt, M.J.A. & Gibson, J.** Phosphate utilization and alkaline phosphatase activity in *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*). *Archives of Microbiology* **102**, 23-28 (1975).

98. **Yeet Yeang, H., Yusof, F. & Abdullah, L.** Protein Purification for the Lowry Assay: Acid Precipitation of Proteins in the Presence of Sodium Dodecyl Sulfate and Other Biological Detergents. *Analytical Biochemistry* **265**, 381-384 (1998).
99. **SHIBATA, K.** SPECTROPHOTOMETRY OF INTACT BIOLOGICAL MATERIALS: ABSOLUTE AND RELATIVE MEASUREMENTS OF THEIR TRANSMISSION, REFLECTION AND ABSORPTION SPECTRA. *J Biochem* **45**, 599-623 (1958).
100. **Gombos, Z., Wada, H. & Murata, N.** Direct Evaluation of Effects of Fatty-Acid Unsaturation on the Thermal Properties of Photosynthetic Activities, as Studied by Mutation and Transformation of *Synechocystis* PCC6803. *Plant Cell Physiol.* **32**, 205-211 (1991).
101. **Trtílek, M., Kramer, D.M., Koblížek, M. & Nedbal, L.** Dual-modulation LED kinetic fluorometer. *Journal of Luminescence* **72-74**, 597-599 (1997).
102. Komenda, J. et al. Accumulation of the D2 Protein Is a Key Regulatory Step for Assembly of the Photosystem II Reaction Center Complex in *Synechocystis* PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 48620-48629 (2004).
103. **Komenda J, Barber, J** Comparison of psbO and psbH deletion mutants of *Synechocystis* PCC 6803 indicates that degradation of D1 protein is regulated by the QB site and dependent on protein synthesis - Biochemistry (ACS Publications). *Biochemistry* **34**, 9625-9631 (1995).
104. **Schägger, H. & von Jagow, G.** Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* **199**, 223-231 (1991).
105. **Sakurai, I. et al.** Requirement of Phosphatidylglycerol for Maintenance of Photosynthetic Machinery. *Plant Physiol.* **133**, 1376-1384 (2003).
106. **Laczko-Dobos, H. et al.** Remodeling of phosphatidylglycerol in *Synechocystis* PCC6803. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 163-170 (2010).
107. **Allahverdiyeva, Y. et al.** The function of D1-H332 in Photosystem II electron transport studied by thermoluminescence and chlorophyll fluorescence in site-directed mutants of *Synechocystis* 6803. *European Journal of Biochemistry* **271**, 3523-3532 (2004).
108. **Yu, B. & Benning, C.** Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **36**, 762-770 (2003).

109. **Sugimoto, K., Midorikawa, T., Tsuzuki, M. & Sato, N.** Upregulation of PG synthesis on sulfur-starvation for PS I in *Chlamydomonas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **369**, 660-665 (2008).
110. **GOMBOS, Z., KIS, M., PÁLI, T. & VIGH, L.** Nitrate starvation induces homeoviscous regulation of lipids in the cell envelope of the blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *European Journal of Biochemistry* **165**, 461-465 (1987).
111. **Reifarth, F. et al.** Modification of the Water Oxidizing Complex in Leaves of the *dgd1* Mutant of *Arabidopsis thaliana* Deficient in the Galactolipid Digalactosyldiacylglycerol†. *Biochemistry* **36**, 11769-11776 (1997).
112. **Sugita, C. et al.** Complete nucleotide sequence of the freshwater unicellular cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 6301 chromosome: gene content and organization. *Photosynthesis Research* **93**, 55-67 (2007).
113. **Miki Hagio, Zoltán Gombos, Zsuzsanna Várkonyi, Kazumori Masamoto, Norihiro Sato, Mikio Tsuzuki, and Hajime Wada** Direct Evidence for Requirement of Phosphatidylglycerol in Photosystem II of Photosynthesis. *Plant Physiol* **124**, 795-804 (2000).

Magyar nyelvű összefoglalás

A cianobaktériumok jelentős szerepet játszottak a Föld mai arculatának kialakításában. Oxigén termelő fotoszintézisük révén rendkívül fontos szerepet játszanak ma is az óceánok biomassza és oxigéntermelésében.^{1,3} A cianobaktériumok rendszertani csoportjai rendkívüli morfológiai és genetikai diverzitást mutatnak, melyben a fonalas, nitrogénkötő cianobaktériumok inkább monofiletikus, míg az egysejtű cianobaktériumok polifiletikus csoportokat alkotnak.² Az oxigén termelő fotoszintézis tanulmányozása szempontjából rendkívül fontos, hogy a cianobaktériumok rendelkeznek egy ún. „kulcsgén-családdal” amely gének más bakteriális törzsekben nem, csupán az oxigéntermelő fotoszintézist végző cianobaktériumokban és magasabbrendű élőlények kloroplasztisz genomjában rendelkeznek ortológokkal.⁶ A kulcsgének között többségében a fotoszintézishez kapcsolódó gének találhatóak. Széles körben elfogadott továbbá, hogy a ma élő, magasabbrendű élőlények kloroplasztisza ősi cianobaktériumok endoszimbiotikus bekebelezésének eredménye. A kloroplasztiszok, és a cianobakteriális sejtek funkcionális és strukturális hasonlósága nem kétséges. Többek között ennek a genetikai, funkcionális hasonlóságnak következtében a cianobaktériumok kiváló modellszervezetek, közülük a *Synechococcus* sp. PCC7942 obligát fotoautotróf és a *Synechocystis* sp. PCC6803 törzsek kiemelkedő fontossággal bírnak.

A fotoszintézis fényreakciói kloroplasztiszok és cianobaktériumok tilakoid membránjába ágyazott fehérjekomplexek segítségével valósulnak meg. Ezek közül a komplexek közül a PSI és PSII kiemelkedő fontosságú a fotokémiai töltésszétválasztás szempontjából. A tilakoid membránban található lipidmolekulák és a PSI, PSII fehérjekomplexek belső alegységei között létrejövő kölcsönhatás jelentősen befolyásolhatja a fotoszintézis biológiai folyamatát, ennek megfelelően a tilakoid membrán lipidösszetétele funkcionális jelentőségű.⁵⁹ Az oxigéntermelő cianobaktériumok többségében a tilakoid membránok igen jellemző, a többi baktériumtól eltérő lipidösszetétellel rendelkeznek. Ebben a tulajdonságukban rendkívül hasonlítanak a magasabbrendű növények, algák kloroplasztisza tilakoidmembránjára.³⁵ A tilakoid membránok főleg neutrális glikolipideket tartalmaznak, melyek szerkezeti és funkcionális szempontból is a legfontosabb lipidosztályok közé tartoznak. A glikolipidek közül az MGDG és DGDG

található meg a legnagyobb arányban. Mindkét lipid szerkezeti elemként alapvetően befolyásolja a tilakoid membrán fizikai tulajdonságait ezzel közvetve a fotoszintézis hatékonyságát. Megjelenésük és elterjedésük foszfátlimitáló körülmények közötti elengedhetetlen szerepüknek köszönhető és egyértelműen kapcsolódik az oxigéntermelő fotoszintézishez.⁴³ A töltéssel rendelkező lipidek kis mennyiségben találhatók meg a tilakoid membránokban. A semleges pH-n negatív töltéssel rendelkező SQDG és az egyetlen foszfolipid PG fehérje-lipid kölcsönhatásokban játszott szerepét számos tanulmányban próbálták felderíteni.⁶⁷

A membránlipidek fotoszintézis folyamataiban betöltött funkciójának tanulmányozására leggyakrabban alkalmazott modellszervezetek a *Synechocystis* sp. PCC6803 és *Synechococcus* sp. PCC7942 cianobaktérium törzsek. Mindkét törzs kiváló modellszervezetnek bizonyult, genomszekvenciájuk ismert, valamint genetikai módosításaik esetében rengeteg tapasztalat halmozódott fel.^{15,112} A két törzs közötti lényeges különbségnek tekinthető, hogy a membránlipidek zsírsavösszetétele jelentősen különbözik egymástól.⁴² A *Synechocystis* sp. PCC6803 inkább a növényekre jellemző, többszörösen telítetlen zsírsavakat tartalmaz, míg a *Synechococcus* sp. PCC7942 a baktériumokra jellemző egyszeresen telítetlen zsírsavakat épít be a membránokat alkotó lipidekbe. A két törzsben az SQDG szerepe is különböző lehet, hiszen *Synechocystis* sp. PCC6803-ban ez a lipid létfontosságúnak tekinthető, míg *Synechococcus* sp. PCC7942 esetében az SQDG szintézisére képtelen mutáns csak foszfátéhezés során mutat különbséget a vad típushoz képest.⁶⁹

A fotoszintézis szempontjából az egyik legintenzívebben tanulmányozott membránkomplex a kettes fotokémiai rendszer (PSII). *Thermosynechococcus elongatus* cianobaktériumból izolált PSII kristályszerkezete alapján mind a PG, mind az SQDG jelentős hatással lehet a PSII *in vivo* szerkezetére.⁸⁹ A 2.9Å felbontású kristályszerkezet alapján PSII monomerenként legalább 18 lipidmolekula található, melyek közül legalább két PG molekula a PSII plasztokinon kötő helyének közelében helyezkedik el, egy pedig a CP43 és D1 fehérjealegységek között található. Korábbi munkák alapján a PG jelentősen befolyásolja a PSII Q_A-Q_B elektronátmenet kinetikáját ezzel funkcionálisan is befolyásolja a fotoszintézis folyamatát.⁷⁵

A PG fiziológiás szerepének tanulmányozása *Synechocystis* sp. PCC6803 $\Delta pgsA$, $\Delta cdsA$ és PAL/ $\Delta cdsA$ mutánsok létrehozásával és karakterizálásával új információkkal gazdagodott.^{113,74,84} Ezek a mutánsok PG szintézisére képtelen, auxotróf mutánsok, melyek képesek a PG-t a külső tápoldatból felvenni és membránjaikba építeni. A külső tápoldatból eltávolítva a PG-t tanulmányozhatóvá válik a kiürülése során jelentkező, a fotoszintézist jelentősen befolyásoló fenotipikus hatások összessége. A mutánsok PG éhezése során gyűjtött adatok rávilágítottak, hogy a PG korai kiürülési fázisában inkább PSII-t érik hatások, míg hosszú távú PG éhezés során csak meglehetősen későn, a PG tartalom jelentős csökkenésekor változik meg a PSI szerkezete és működése.⁷⁷ A PG kiürülés hatására az eredetileg trimer szerkezet monomerizálódik és ezáltal aktivitásuk is változik az említett mutánsokban.

Munkám során célul tűztem ki *Synechococcus* sp. PCC7942 PG auxotróf mutáns létrehozását és tanulmányozását. Ez a cianobaktérium zsírsavösszetételét tekintve jelentősen különbözik a korábbi modellektől, valamint az SQDG szerepe nem esszenciális a mutáns fotoautotróf növekedése szempontjából. A *Synechococcus* sp. PCC7942 csak obligát fotoautotróf növekedésre képes szemben a *Synechocystis* sp. PCC6803 törzsszel, mely képes foheterotróf módon, glükóz szénforrást felhasználva növekedni. A PG szintézisére képtelen *Synechococcus* sp. PCC7942 mutáns tanulmányozása során értékes információkhoz juthatunk a PG esetleges törzsspecifikus szerepére vonatkozóan. A mutáns jellemzése során a PG hatását leginkább a PG megvonás során bekövetkező változások mérésével határoztuk meg (növekedés, fotoszintézis, lipid összetétel) a közvetett és közvetlen hatások megállapításával.

A *Synechococcus* sp. PCC7942 genomszekvenciája alapján azonosítottam a *cdsA* gént, mely a PG szintézisének egyik kulcsenzimét kódolja. Inszerciós mutagenézis technikájával antibiotikum rezisztencia markerre cseréltem le a kromoszómán található gén jelentős részét, majd a létrehozott mutánst jellemeztem. A mutáns növekedése egyértelműen PG auxotróf volt, azaz csupán PG jelenlétében volt életképes. PG megvonás hatására a növekedése 4 nap után lelassult, majd leállt és 9 napon keresztül a kultúrák sejtszáma nem változott. A 9. naptól kezdődően a kultúrákban található élő sejtek száma jelentősen lecsökkent és 13 nap PG éhezést követően elpusztultak a sejtek. A *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutáns növekedése szempontjából különbözött a

Synechocystis sp. PCC6803/ Δ *pgsA* és PAL/ Δ *cdsA* mutánsoktól, mivel a PG megvonásra érzékenyebben reagált, mely az élő sejtek számának drasztikus csökkenésével járt.^{113,84}

A részletesebb jellemzés érdekében a sejtek fehérje és pigment tartalmát is végigkövettem PG jelenlétében és PG hiányában nevelt kultúrák esetében. A sejtek klorofill tartalma érzékenyebben reagált a PG megvonás hatására, mint a teljes fehérjetartalom, ami arra utalhat, hogy a pigmentek stabilitását is befolyásolhatja a PG éhezés. Spektroszkópiai vizsgálatokkal kimutattam, hogy a sejtek fikobiliprotein tartalmához képest a klorofill tartalom jelentősen csökken 6-10 nap PG éhezés során. Ezt a mérési eredményt alátámasztja a fehérje, klorofill arány meghatározása is.

A Δ *cdsA* mutáns lipid és zsírsavösszetétele is megváltozik PG éhezés hatására. Az általunk a sejtekhez adott mesterséges zsírsavtartalmú PG mennyisége a sejtek mennyiségének duplázódását követve feleződik, azaz 6 nap PG éhezést követően 2 % körüli értékre csökken a kiindulási 8-10 %-os PG mennyiséghez képest. Ez egyértelmű bizonyítéka a mutáns PG auxotróf fenotípusának, azaz annak, hogy a mutáns képtelen a PG *de novo* szintézisére. A PG mennyiségének csökkenésével egyidőben a mutáns sejtek SQDG tartalma jelentősen, 6 %-ról 12 %-ra nőtt, ami arra utalhat, hogy bizonyos funkciókban ezek a lipidek képesek egymás szerepét átvállalni. Korábbi eredmények is arra utalnak, hogy a PG és SQDG együttesen határozzák meg a membránlipidek negatív töltésének jelentős részét, valamint mennyiségük egymáshoz képest finoman szabályozott egyensúlyban van.⁶⁷ Az egyes lipidosztályok mennyiségének változásával egyidőben a sejtekben található maradék PG zsírsavösszetétele is jelentős változáson megy keresztül. A mesterséges PG esetében az *sn-1* és *sn-2* pozícióban is olajsav észteresít. A *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutánsból PG éhezés során izolált PG zsírsav oldalláncaihoz kötve feldúsul a telített 16 szénatomszámú (16:0) palmitinsav, valamint jelentősen lecsökken az eredetileg jelen levő egyszeresen telítetlen olajsav mennyisége. Ez a kicserélődés arra utal, hogy a sejtek ugyan felveszik a mesterséges lipid származékot, de azt igyekeznek jóval természetesebb zsírsav összetételű PG-vé alakítani. Ezt a folyamatot eddig csupán eukariótákban írták le, illetve *Synechocystis* sp. PCC6803/ Δ *pgsA* mutáns vizsgálata során derítették fel részleteit cianobaktériumokban.¹⁰⁶

PG éhezés során a *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns tilakoid membránjában található fehérjék oligomerizációs állapota is jelentős változásokon megy

keresztül. A mutánsból izolált PSI és PSII komplexek esetében megfigyeltük a PSII dimerek monomerizációját, valamint a PSI trimerek mennyisége is csökkent 5 nap PG éhezést követően. A PG megvonás egyik legjelentősebb következménye volt a tilakoid membránban felhalmozódó, de be nem épült D1 fehérjealegység mennyiségének komoly növekedése (PSII). Ez egyértelműen arra utal, hogy önmagában zavartalan fehérjeszintézis mellett az újonnan szintetizálódó D1 alegységek PSII-be történő beépülésében is aktív szerepet játszik a PG. *Synechocystis* sp. PCC6803 PG auxotróf mutánsok vizsgálata során szintén megfigyelhető volt a PSII, PSI monomerizációja, de nem volt jelentős D1 alegység felhalmozódás, inkább a CP43 alegység *in vivo* leszakadása történt meg a reakciócentrumról.⁸⁴

A *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns fotoszintetikus paramétereit PG éhezés során folyamatosan vizsgáltuk. Az oxigénfejlesztő aktivitást mesterséges kinon (pBQ) jelenlétében, amivel közvetlenül a PSII aktivitását mértem, valamint a teljes oxigénfejlesztő aktivitást is követtem. A mutáns mindkét jellemző oxigénfejlesztő aktivitása fokozatosan csökkent PG éhezés során. Ebből arra következtettem, hogy a PG elengedhetetlen komponense a fotoszintetikus elektrontranszport folyamatoknak. Hasonló csökkenésről számoltak be a *Synechocystis* sp. PCC6803/ Δ *pgsA* és Δ *cdsA*/PAL mutánsokon végzett mérések alapján is.^{113,74,84} A két törzs közötti jelentős különbséget a Flash-indukált fluoreszcencia lecsengés mérése során dokumentáltuk. *Synechocystis* sp. PCC6803/ Δ *pgsA* mutáns mérése során egyértelmű gátlódását figyeltük meg a Q_A - Q_B elektronátmenetnek, ami a PSII belső elektrontranszportjának gátlására utal. A *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns mérése során azonban inkább a Q_A^- - Q_B / Q_A - Q_B^- egyensúlyi állandó jelentős eltolódását figyeltük meg a Q_A^- - Q_B állapot irányába.

A *Synechococcus* sp. PCC7942/ Δ *cdsA* mutáns jellemzése során tehát megállapítottuk, hogy a PG-nek jelentős szerepe van a sejtekben található fotoszintetikus komplexek oligomer állapotának fenntartásában, valamint közvetlen hatással van a PSII belső elektrontranszportjára. A fotoszintetikus aktivitás gátlását valószínűleg a PSII akceptor oldalának zavara okozza PG hiányában, mivel a donor oldal problémáira utaló jeleket nem sikerült azonosítanunk. Mindezek az eredmények a PG hiányában nevelt cianobaktériumok vizsgálatából következnek és rávilágítanak arra, hogy a PG esetlegesen

különböző, törzs specifikus feladatokat lát el különféle közel rokon cianobaktériumokban, illetve magasabbrendű növények, algák kloroplasztiszában.

English summary

The cyanobacteria played dominant role in shaping Earth's face from the distant past since approximately 3 billion years ago. Due to their ability of oxygenic photosynthesis they possess still significant role in biological oxygen, and biomass production of the biosphere.^{1,3} The phylogenetic distribution of cyanobacterial strains shows extreme diversity in which the filamentous strains display monophyletic and the unicellular strains show polyphyletic properties based on genetic, and morphological studies.² In the study of oxygenic photosynthesis it is really important that cyanobacterial genomes contain a rather small fraction of signature genes, which orthologues could be identified only in oxygenic photosynthesizing cyanobacteria and in higher plant chloroplast genomes and could not in other bacterial strains.⁶ Amongst these signature genes the photosynthesis related genes are not surprisingly abundant. Furthermore it is widely accepted, that higher plant chloroplasts evolved from ancient, unicellular cyanobacterium as a result of one or more endosymbiotic events. The functional and structural relationship between chloroplasts and cyanobacteria is evident. As a result of this similarity the cyanobacteria are excellent model organisms in the study of photosynthetic processes; amongst them the unicellular, obligatory photoautotrophic *Synechococcus* sp. PCC7942 and *Synechocystis* sp. PCC6803 strains are particularly important.

The light reactions of photosynthesis take place on the so called thylakoid membranes of cyanobacteria and chloroplasts using membrane embedded protein complexes. From the viewpoint of photochemical charge separation the PSI and PSII complexes are particularly important. The biological processes of photosynthesis are highly affected by the lipid composition of thylakoid membranes, therefore the interactions between lipids and proteins in this membrane have functional importance.⁵⁹ In cyanobacteria the thylakoid membranes have very conserved lipid composition, which is rather different from that of bacterial membranes and very similar to the lipid composition of higher plant chloroplast thylakoids.³⁵ The majority of thylakoid lipids are neutral glycolipids from which the neutral MGDG and DGDG could be found in the largest amount. As a structural element of the membranes both lipid classes play important roles in oxygenic photosynthesis, due to determining the physical properties of thylakoids. They

appearance and distribution amongst ancestral cyanobacteria is the consequence of adaptation to phosphate limiting environmental conditions.⁴³ As the minorities of thylakoid lipids, the anionic SQDG and PG have also important roles in protein-lipid interactions as it was shown in previous studies.⁶⁷

Synechocystis sp. PCC6803 and *Synechococcus* sp. PCC7942 cyanobacterial strains are the most popular model organisms in researching the role of membrane lipids in photosynthesis. The genome sequences of these two strains are available and there are lots of experiences accumulated during the genetic manipulation of them.^{15,112} In the fatty acid composition of membrane lipids there is a remarkable difference between the two strains.⁴² The *Synechocystis* sp. PCC6803 contains polyunsaturated fatty acids and thus it is more similar to higher plant systems. However *Synechococcus* sp. PCC7942 strain incorporates only monounsaturated fatty acids into its lipids. The role of SQDG could be different in the two strains, because SQDG in *Synechocystis* sp. PCC6803 is essential compared to *Synechococcus* sp. PCC7942 where it is dispensable membrane lipid component.⁶⁹ The SQDG mutant *Synechococcus* sp. PCC7942 shows physiological disturbances only under phosphate limiting conditions.

In the research of photosynthetic processes the most intensively studied photosynthetic complex is the PSII complex. The data coming from *Thermosynechococcus elongatus* PSII crystal structure suggesting that both SQDG and PG plays important roles in the stability of PSII complex *in vivo*. Based on the 2.9Å resolution structure there are at least 18 lipids per monomer in PSII. From those lipids there are two PG molecules in the vicinity of plastoquinone binding site, the Q_B site and one molecule PG is located between CP43 and D1 subunits of the complex.⁸⁹ Previous studies pointed out, that PG could functionally affect the internal electron transfer of PSII, due to the displayed influence on Q_A-Q_B electron transfer kinetics.⁷⁵

During the past few years many information have arisen from the studies of *Synechocystis* sp. PCC6803 Δ *pgsA*, Δ *cdsA* and PAL/ Δ *cdsA* mutants.^{73,74,84} These mutants are auxotrophic mutants that are unable to synthesize PG *de novo*, but they could take it up from the growth medium. Removing the PG from the growth medium causes typical phenotypic changes that could be followed during the starvation period. These data suggest that in early phase of PG starvation mainly PSII functions are disturbed and defects on PSI

can only be detected after longer term (14 days) PG depletion.⁷⁷ From these results it is clear that PG has dominant effect on the oligomerisation state of thylakoid membrane protein complexes.

My aim was to construct a PG auxothrophic mutant of *Synechococcus* sp. PCC7942 and characterize it in detail. This particular strain is different from *Synechocystis* sp. PCC6803 in the saturation of its fatty-acyl lipid sidechains. Furthermore the lethality of SQDG synthetic mutants in *Synechocystis* sp. PCC6803 suggests that the role of SQDG could be completely different in the two strains. The photoautotrophic growth characteristics are also different between the two model organisms. The *Synechocystis* sp. PCC6803 has the ability to utilize external carbon sources during photoheterotrophic growth, however the *Synechococcus* sp. PCC7942 is an obligatory photoautotrophic cyanobacterium. During the characterization of PG auxothrophic *Synechococcus* sp. PCC7942 mutant there could be novel results obtained on the possible strain-specific roles of PG amongst different cyanobacterial strains. During the work direct and indirect effects of PG depletion were observed on the growth, photosynthesis, lipid composition of the mutant respectively.

Based on the genom sequence of *Synechococcus* sp. PCC7942 I have identified the *cdsA* gene, which encodes a crucial enzyme of PG biosynthesis. I have replaced a part of the gene on the chromosome to an antibiotic cassette using insertional mutagenesis. The mutant was viable only in the presence of exogenously added PG to the medium. The mutant growth stopped after 4 days and was viable for 13 days in the absence of GP. Strong decrease could be identified in the viable cell number after 9 days of PG depletion and after 13 days of PG starvation the cells died. The *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutant responded differently to PG starvation compared to *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ or PAL/ $\Delta cdsA$ mutants. The *Synechococcus* mutant have shown increased sensitivity to PG starvation and additionally the strong decrease in viable cell number could not be observed in latter, *Synechocystis* mutants.^{73,84}

Based on the more detailed measurements of total protein, and pigment content of the mutant it is clear, that the amount of chlorophyll decreased more rapidly, than the protein content. This could be the effect of PG starvation on the stability of cellular pigments in *Synechococcus* sp. PCC7942. Moreover after 6-10 days of PG starvation the

ratio of chlorophyll/ficobiliprotein content of the cells decreased rapidly as I have shown by spectroscopic measurements and by determination of chlorophyll/total protein ratio.

PG starvation has effects on the total lipid and fatty acid content of the mutant during starvation. The amount of PG in extracted samples of mutants followed the number of cell duplications and decreased to 2 % from the original 8 – 10 % after 4 days of starvation evidenced that the mutant is unable to synthesize PG *de novo*. Simultaneously with the depletion of PG the amount of SQDG increased to 12 % from 6 % suggesting, that PG and SQDG could partially replace each others function in photosynthetic membranes. Previous results also suggest that the total negative charge of the thylakoid membrane is strictly regulated, and depends on the total balance of PG and SQDG content of the membrane.⁶⁷ In parallel with the changes in lipid composition the fatty acid composition of remaining lipids have also changed significantly. Both in *sn-1* and *sn-2* positions monounsaturated oleic acid (18:1) esterified the glycerol backbone in exogenously added, artificial PG. Strong replacement of the oleic acid content to saturated palmitic acid (16:0) have been observed during PG starvation in *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutant. This replacement suggests that the mutant cells have taken up the artificial lipid from the medium, and changed the fatty acid content to a more naturally one after they incorporated it into their membranes. This lipid retailoring process was previously described in eukaryotes and only very recent results identified the same process in *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ mutant cyanobacterium.¹⁰⁶

During PG starvation the oligomeric state of thylakoid complexes changed significantly. We observed strong monomerisation of PSII complexes in parallel with the decreasing of PSI trimers in isolated thylakoid membranes after 5 days of PG depletion. Accumulation of unassembled D1 subunits in the thylakoid membranes was the most serious consequence of PG starvation. This suggests that in the presence of unperturbed protein synthesis the incorporation of PSII subunits into the complex is inhibited by the decreased amount of PG. Completely different results were observed in the case of *Synechocystis* sp. PCC6803 PAL/ $\Delta cdsA$ mutant. The monomerisation of PSI and PSII complexes was the same, but instead of increase in unassembled D1 protein amount the detachment of CP43 from the PSII complex has been observed.⁸⁴

The photosynthetic parameters of *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutant were continuously monitored during PG depletion. The oxygen evolving activity was measured in the presence of artificial quinone (pBQ) in order to measure direct (H₂O to pBQ) PSII activity and without it in order to measure net photosynthetic activity (H₂O to CO₂). Both activities were decreasing rapidly during PG starvation suggesting that PG is an indispensable component of photosynthetic electron transport in cyanobacteria. This phenomenon was similar to that have been observed in the case of *Synechocystis* sp. PCC6803 $\Delta pgsA$, $\Delta cdsA$ and PAL/ $\Delta cdsA$ mutants previously.^{73,74,84} We observed significant difference in the flash-induced fluorescence relaxation kinetics between *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ and *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ mutants. In the latter PG depletion caused a shift of Q_A-Q_B/Q_A-Q_B- equilibrium towards Q_A-Q_B. However in *Synechocystis* sp. PCC6803/ $\Delta pgsA$ mutant the electron transfer between Q_A- and Q_B is probably inhibited suggesting a direct effect of PG on PSII charge transfer kinetics.

During the characterization of *Synechococcus* sp. PCC7942/ $\Delta cdsA$ it is revealed, that PG has dominant effect on the stability of oligomeric protein complexes and the internal electron transfer of PSII. There was no signal of PSII donor side problems during PG depletion, thus the inhibition of oxygen evolving activity is possibly caused by the disturbances in the acceptor side of PSII. All these data observed during the starvation of PG auxotrophic cyanobacteria and suggest that PG has possibly strain specific and universal functions in photosynthetic organisms.

Publikációs lista:

A dolgozatban felhasznált közlemény:

Bogos B, Ughy B, Domonkos I, Laczko-Dobos H, Komenda J, Abasova L, Cser K, Vass I, Sallai A, Wada H, Gombos Z (2010) Phosphatidylglycerol depletion affects photosystem II activity in *Synechococcus* sp. PCC7942 cells PHOTOSYNTH RES 103:(1) 19-30
IF: 2.681

A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények:

Domonkos I, Malec P, Sallai A, Kovacs L, Itoh K, Shen GZ, Ughy B, **Bogos B**, Sakurai I, Kis M, Strzalka K, Wada H, Itoh S, Farkas T, Gombos Z (2004) Phosphatidylglycerol is essential for oligomerization of photosystem I reaction center PLANT PHYSIOL 134: 1471-1478
IF: 5.881

Apostolova EL, Domonkos I, Dobrikova AG, Sallai A, **Bogos B**, Wada H, Gombos Z, Taneva SG (2008) Effect of phosphatidylglycerol depletion on the surface electric properties and the fluorescence emission of thylakoid membranes J PHOTOCH PHOTOBIO B 91:(1) 51-57
IF: 1.838

Laczko-Dobos H, Ughy B, Toth SZ, Kornenda J, Zsiros O, Domonkos I, Parducz A, **Bogos B**, Komura M, Itoh S, Gombos Z (2008) Role of phosphatidylglycerol in the function and assembly of Photosystem II reaction center, studied in a *cdsA*-inactivated PAL mutant strain of *Synechocystis* sp. PCC6803 that lacks phycobilisomes BBA-BIOENERGETICS 1777:(9) 1184-1194
IF: 4.447

Egyéb közlemények:

Takacs M, Toth A, **Bogos B**, Varga A, Rakhely G, Kovacs KL (2008) Formate hydrogenlyase in the hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus litoralis* BMC MICROBIOL 8: 10.1186/1471-2180-8-88- p.
IF: 2.877

Köszönetnyilvánítás:

Köszönettel tartozom a **Növényi lipid szerkezet és funkció csoport** minden jelenlegi és volt tagjának a munkám során nyújtott segítségért, különös tekintettel Gombos Zoltán csoport és témavezetőmnek.

Külön köszönet illeti Sallai Anna laborasszisztensként nyújtott segítségét, az alapvető cianobakteriális fiziológiai módszerek bemutatásáért és a tapasztalat trükkjeinek átadásáért.

Külön köszönet Prof. Solymosy Ferenc, Racskóné Domonkos Ildikó és Ughy Bettina közlemények lektorálásában nyújtott segítségéért.

Köszönet illeti Vass Imre, Leyla Abasova és Cser Krisztián segítségét a Flash-indukált fluoreszcencia mérésében nyújtott segítségért.

Köszönettel tartozom Josef Komendának és kollégáinak a BN-2D-PAGE megvalósításában nyújtott elengedhetetlen segítségéért.

Köszönet Ghada Ajlaninak a rengeteg hasznos tanácsért.

Külön köszönet a *Synechococcus* sp. PCC7942 cianobaktériumnak a folyamatos szakmai kihívásért.